

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Implication des pectines méthylestérases dans le ramollissement du réceptacle de la fraise (*Fragaria X ananassa*) au cours de la maturation

DEHALU, Vincent

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**IMPLICATION DES PECTINES METHYLESTERASES DANS LE RAMOLLISSEMENT DU
RECEPTACLE DE LA FRAISE (*FRAGARIA X ANANASSA*) AU COURS DE LA MATURATION**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Vincent DEHALU

Juin 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72..... - Téléfax: + 32(0)81.72.....
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**IMPLICATION DES PECTINES METHYLESTERASES DANS LE RAMOLLISSEMENT DU
RECEPTACLE DE LA FRAISE (*FRAGARIA X ANANASSA*) AU COURS DE LA MATURATION**

DEHALU Vincent

Résumé

La texture est une caractéristique commercialement importante chez les fruits, elle peut affecter entre autre, la qualité nutritive du fruit, sa longévité après la récolte et sa rentabilité sur le marché. Cette texture est déterminée par la dégradation de la paroi cellulaire par des enzymes hydrolytiques lors des derniers stades de maturation du fruit. La fraise subit lors du mûrissement une perte importante de l'intégrité de sa texture.

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les phénomènes menant à la fragilisation de la fraise en étudiant une enzyme pariétale, la pectine méthylestérase (PME), susceptible d'être impliquée dans le processus de maturation des fruits. Pour ce faire nous avons entrepris une étude biochimique et moléculaire de l'enzyme chez la variété de fraisier Calypso.

Dans la première partie de ce travail nous nous sommes intéressés à la modification du substrat pectique par ces enzymes ainsi qu'à leur activité lors des différents stades de maturation du fruit.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons réalisé le clonage de séquences de PME.

Enfin, nous avons entrepris la transformation de fraisiers avec une construction ARNi dirigée contre les PME.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

Promoteur: P. Van Cutsem

Tout d'abord, je tiens à remercier particulièrement le Professeur Messiaen de m'avoir accueilli dans son laboratoire et ainsi de m'avoir permis d'y réaliser ce mémoire.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Van Cutsem d'avoir accepté d'être le promoteur de ce mémoire.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury pour avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit.

Un tout grand merci à Mallory pour m'avoir encadré tout au long de ce mémoire, de ses connaissances et de son attention.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'unité URBV pour leur conseil, leur aide, leur bonne humeur au quotidien et leur disponibilité.

Un grand merci à Caroline pour sa tendresse, son soutien et sa motivation au quotidien.

Enfin, je tenais à remercier mes parents, ma sœur et ma famille pour leur épaulement tout au long de l'année. .

Abréviations

%	pourcent
°C	degré Celsius
μl	microlitre
μM	micomole
2,4 D	acide dichlorophénolacétique
ADNc	ADN complémentaire
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARN m	ARN messenger
ARNi	ARN interférent
BAP	benzylaminopurine
Ca	calcium
cm	centimètre
EDTA	éthylène diamine tétracétique
GA3	acide gibbérellique
gr	gramme
h	heure
IBA	acide indobutyrique
IEF	isoelectrofocalisation
Kb	kilo base
l	litre
M	molaire
mA	milliampère
min	minute
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimole
MS	murashige Skoog
ng	nanogramme
nt	nucléotide
pb	paire de base
PCR	polymerase chain reaction
PG	polygalacturonase
PGA	acide polygalacturonique
PL	pectate lyase
pM	picomole
PME	pectine méthylestérase
rpm	rotation par minute
SL	smart ladder
T AE	tris acétate EDTA
TDZ	thidiazuron
U	unité
UV	ultraviolet
V	volt
W	watt
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
IPTG	isopropyl, β-D thiogalactopyranoside
RACE	rapid amplification of cD NA ends
Taq polymerase	Thermophilus aquaticus polymerase
Tris	tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
X-Gal	5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β -D galactopyranoside

Objectif général du travail

Lors de l'étape finale du développement, un fruit, en plus d'accumuler des composés organoleptiques et des pigments, subit également le ramollissement de sa texture. Ce dernier phénomène a pour origine la dégradation de la paroi cellulaire sous l'action d'enzymes hydrolytiques dont font partie les pectines méthylestérases (PME).

L'objectif de ce mémoire est de mieux connaître le rôle joué par les PME dans le ramollissement du réceptacle de la fraise. Pour ce faire, nous avons entrepris une étude biochimique et moléculaire des enzymes PME chez Calypso, une variété remontante de fraisier.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la modification des pectines pariétales par ces enzymes, ainsi qu'à leur activité lors des différents stades de maturation du fruit. Dans la seconde partie, nous avons réalisé le clonage de séquence de PME. Enfin, nous avons entrepris la transformation de fraisiers avec une construction ARNi dirigée contre ces PME.

Table des matières

Chapitre I. Introduction	10
1. Introduction générale et problématique.....	10
2. Le développement et la maturation des fruits	10
2.1. Généralités.....	10
2.2. Croissance des fruits.....	11
2.3. Maturation des fruits	11
2.3.1 Les pigments	12
2.3.2. Les changements de saveur du fruit	13
2.3.2.1. L'assimilation de sucres et d'acides organiques	13
2.3.2.2. Les composés volatils.....	13
2.3.3. Le ramollissement de la paroi : implication enzymatique.....	13
2.4. La paroi cellulaire végétale	15
2.4.1. La cellulose	16
2.4.2. Les hémicelluloses	16
2.4.3. Les pectines	17
2.4.3.1. Structure des pectines.....	18
2.4.3.2. Synthèse des pectines	19
2.4.4. Les principales enzymes hydrolytiques.....	22
2.5. Les Pectines méthylestérases	22
2.5.1. Structure des PME.....	23
2.5.2 Mode d'action des PME	26
2.5.3. Régulation des PME	26
3. Présentation du matériel végétal : Le fraisier	28
3.1. Description générale.....	28
3.2. Le fraisier moderne : <i>Fragaria x ananassa</i>	29
3.3. Développement et maturation de la fraise	29
3.3.1. Le rôle de l'auxine dans le développement de la fraise	30
3.3.2. Les modifications pigmentaires	31
3.3.3. L'arôme de la fraise et l'accumulation de sucres	31
3.3.4. Les enzymes impliquées dans la maturation de la fraise	32
3.3.4.1. Les cellulases.....	32
3.3.4.2. Les expansines.....	33
3.3.4.3. Les polygalacturonases	33
3.3.4.4. Les pectate lyases	34
3.3.4.5. Les pectines méthylestérases.....	34
Chapitre II. Matériels et méthodes	35
1. Test immunochimique : ELISA inhibiteur.....	36
2. Méthode relative à l'analyse des protéines	37
2.1. Extraction des protéines pariétales du fruit	37
2.2. Dosage des protéines (Kit NanoOrange, Molecular Probes)	37
2.3. Vérification de l'activité PME en « Cup-Plate ».....	38

2.4. Analyse de l'activité PME par test colorimétrique	38
2.5. Isoélectrofocalisation (IEF).....	38
3. Méthode relative à l'ARN	39
4.1. Extraction d'ARN total (Kit Quiagen)	39
4.2. Synthèse de cDNA (Kit Amersham/Pharmacia).....	39
4. Méthode relative à l'ADN.....	40
4.1. Extraction d'ADN génomique (Kit Sigma)	40
4.2. Réaction de PCR	40
4.2.1. Réaction d'amplification à partir d'ADN en solution.....	40
4.2.2. Réaction d'amplification sur colonies bactériennes.....	40
4.2.3. Cycles d'amplification typiques.....	40
4.3. Electrophorèse d'ADN (gel horizontal)	40
4.4. Clonage des inserts.....	41
4.4.1. Culture d'Escherichia coli.....	41
4.4.2. Préparation de l'ADN plasmidique d'Escherichia coli (Kit Roche)	42
4.4.3. Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose (Kit Qiagen).....	42
4.4.4. Purification par le système Microcon (Millipore).....	43
4.4.5. Réaction de ligation.....	43
4.4.5. Transformation des bactéries TOP10 (kit One Shot, Invitrogen)	43
4.5. 3' et 5' RACE PCR, Kit Marathon (bd-biosciences).....	44
5. Méthode relative à la transformation des fraisiers par Agrobacterium tumefaciens.....	44
5.1. Milieux de culture pour fraisiers in vitro	44
5.2. Protocole de transformation de fraisiers Calypso par Agrobacterium tumefaciens..	46
Chapitre III. Résultats et discussions	47
1. Rappel de la maturation et du ramollissement	48
1.1. Compréhension actuelle de la maturation de la fraise.....	48
1.2. L'étude des enzymes impliquées dans le ramollissement.....	48
1.3. Hypothèse sur la pectine et sur sa méthylation	48
2. Etude biochimique des PME	49
2.1. La déméthylestérification des pectines au cours de la maturation	49
2.1.1. Préparation du matériel végétal.....	49
2.1.2. Principe du test immunochimique.....	49
2.1.3. Résultats de l'ELISA par inhibition.....	50
2.1.3.1. La droite de calibration	50
2.1.3.2. Analyse des échantillons à l'état natif.....	50
2.1.3.3. Analyse des échantillons déestérifiés chimiquement	51
2.1.3.3. Normalisation des résultats et comparaison entre les stades de développement	53
2.2. Mise en évidence de l'activité PME au cours du développement du fruit.....	54
2.2.1. Extraction et quantification des protéines pariétales.....	54
2.2.2. Mise en évidence de l'activité pectine méthylestérase au cours du développement du fruit.....	55
2.2.2.1. Principe du « cup plate »	55
2.2.2.2. Résultats du « Cup plate ».....	55

2.2. 3. Comparaison de l'activité PME au cours du développement	56
2.2.3.1. Principe du test colorimétrique	56
2.2.3.2. Résultat du test colorimétrique.....	56
2.2.4 Mise en évidence de l'expression d'isoformes PME par isoélectrofocalisation.	57
2.2.4.1. Principe de l'isoélectrofocalisation	57
2.2.4.2. Résultats de l'isoélectrofocalisation.....	58
3. Etude moléculaire des PME	61
3.1. Obtention de séquences partielles de PME	61
3.1.1. Choix des amorces PCR.....	61
3.1.2. Extraction d'ARN total et synthèse d'ADNc.....	61
3.1.3 Amplification PCR sur ADNc.....	62
3.1.4. Clonage des amplicons dans pCRII et transformation d'Escherichia coli	62
3.1.5. Séquençage et analyse de la séquence des inserts.....	63
3.2. Réaction RACE	68
3.2.1. Principe du 3' et 5' RACE (kit Marathon cDNA Bd-Bioscience).....	67
3.2.2. Résultats des 3' et 5' RACE PCR	67
4. Transformation de fraisiers avec une construction ARNi-PME	70
4.1. Obtention du matériel végétal en culture in vitro.....	70
4.2. Transformation des fraisiers par Agrobacterium tumefaciens	71
4.1.1. La transformation végétale et le mécanisme de l'ARN interférent.....	71
4.1.2. Description de la construction ARN interférent et du vecteur pBI-121	72
4.1.3. Transformation de fraisiers Calypso	73
Chapitre IV. Discussion générale.....	76
Chapitre V. Perspectives	79
Bibliographie.....	81

Chapitre I. Introduction

Chapitre I. Introduction

1. Introduction générale et problématique

Les vertus nutritionnelles et diététiques des fruits et légumes ne sont plus à démontrer. Ils sont des constituants majeurs de la nutrition humaine et contribuent pour une large part à notre apport en vitamines, fibres, sels minéraux et oligo-éléments. L'amélioration de la qualité des fruits offre un bénéfice pour le consommateur mais également pour le producteur en réduisant les pertes et en augmentant les rendements.

La texture est une caractéristique commercialement importante chez les fruits, elle peut affecter entre autres, la qualité nutritive du fruit, sa longévité après la récolte et sa rentabilité sur le marché. Cette texture est déterminée par la dégradation de la paroi cellulaire par des enzymes hydrolytiques lors des derniers stades de maturation du fruit.

La fraise, un fruit commercialement très important en Belgique, et de plus en plus en région wallonne, subit lors du mûrissement une perte importante de l'intégrité de sa texture. Ce phénomène implique une cueillette manuelle des fruits, un stockage limité dans le temps et des circuits de distribution courts. De plus, la demande permanente de fruits par les industriels oblige à congeler une partie des stocks. Lors de la décongélation, les fruits perdent en partie leurs qualités organoleptiques et physiques, indispensables pour la réalisation de produits tels les confitures, sirops et coulis.

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les phénomènes menant à la fragilisation de la fraise en étudiant une enzyme pariétale, la pectine méthylestérase (PME), susceptible d'être impliquée dans le processus de maturation des fruits.

2. Le développement et la maturation des fruits

Lors de son développement, le fruit subit d'abord une phase de croissance rapide, suivie par des changements de composition chimique et un ramollissement de sa texture (figure 1).

Dans cette partie du manuscrit, nous allons faire une description générale du développement et la maturation des fruits.

2.1. Généralités

Le fruit a pour origine une inflorescence d'angiosperme. Son développement commence par la fécondation de l'ovule par le pollen et se termine par l'abscission. Les rôles principaux d'un fruit sont la protection de la graine en lui conférant des conditions environnementales optimales (eau, gaz, composés chimiques...) et une dissémination de ces graines par les animaux.

La graine provient du développement de l'ovule, mais la croissance des tissus charnus du fruit peut avoir plusieurs origines différentes. Ainsi, on distingue les vrais fruits des faux fruits. Dans le cas des vrais fruits, tel le raisin, les tissus charnus proviennent de la différenciation des tissus de l'ovaire. Par contre, pour les faux fruits comme la fraise, cette différenciation se fait au départ de tissus accessoires et non ovariens (Coombe, 1976).

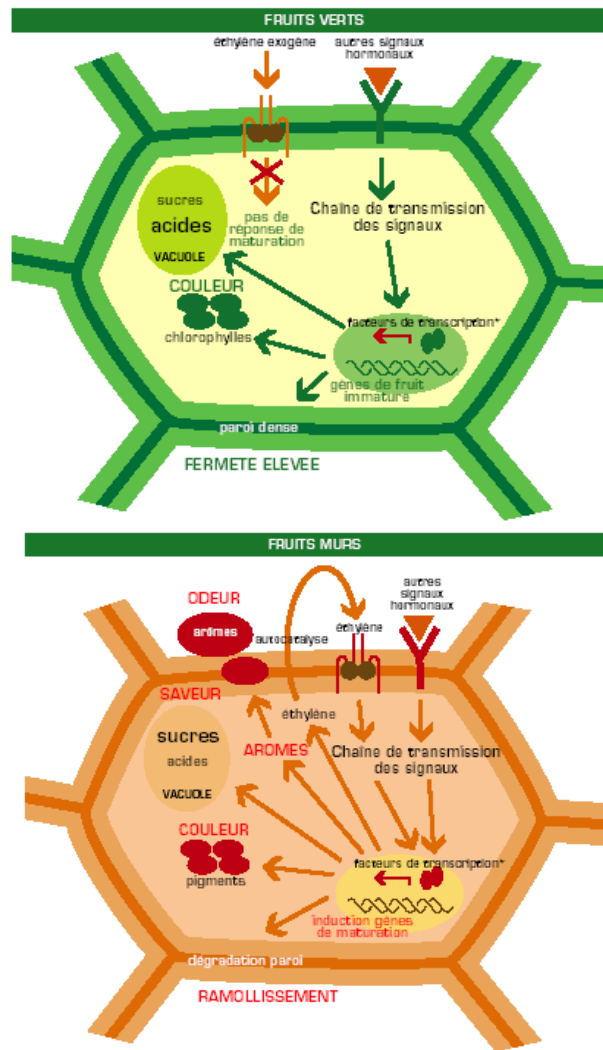


Figure 1. Représentation schématique des modifications observées lors du passage du fruit vert au fruit mûre. Lors des premiers stades de développement, le fruit est généralement aigre, chlorophyllien, sans saveur et ferme. Au cours la maturation, il va accumuler des pigments, des sucres, des composés organoleptiques et sa texture va se modifier.

2.2. Croissance des fruits

Lors du développement du fruit, on observe une multiplication du nombre de cellules ainsi qu'une augmentation du volume de celles-ci, ce qui entraîne une augmentation de la taille du fruit. La graine va produire des cytokinines, qui vont induire la division des cellules de l'enveloppe de l'ovaire ou des tissus accessoires. Cette graine va produire de l'acide gibbérellique qui est responsable de l'expansion rapide de chacune des cellules. Ensuite la plante va produire de l'acide abscissique, ce qui va entraîner l'arrêt du développement de l'embryon à l'intérieur de la graine. Cette étape évite la germination de la graine dans ce milieu généralement chaud et humide (Koning R.E., 1994).

2.3. Maturation des fruits

La maturation constitue l'étape finale dans le développement d'un fruit. Elle nécessite la synthèse de nouvelles protéines et d'ARN messagers, mais aussi de nouveaux pigments et de composés aromatiques. Ces processus anaboliques requièrent à la fois de l'énergie et une source de carbone. Bien que tous les fruits réalisent la respiration, il existe néanmoins des différences dans les taux et dans l'évolution de la respiration entre les fruits. Les fruits sont classés en 2 catégories : climactériques et non climactériques, selon qu'ils présentent ou non

au moment de la maturation, une augmentation brusque de la respiration associée à une synthèse de l'hormone végétale gazeuse, l'éthylène (figure 2). Celle-ci joue un rôle très important dans le déclenchement et la régulation de la maturation des fruits climactériques, en activant la synthèse et l'activité de protéines impliquées dans le phénomène de mûrissement. Chez ces fruits, l'éthylène va stimuler sa propre production (phénomène d'autocatalyse), ce qui peut permettre au fruit de mûrir même après la cueillette. Chez les fruits non climactériques comme la fraise, l'éthylène n'a pas d'effet sur le développement du fruit au moment de la maturation.

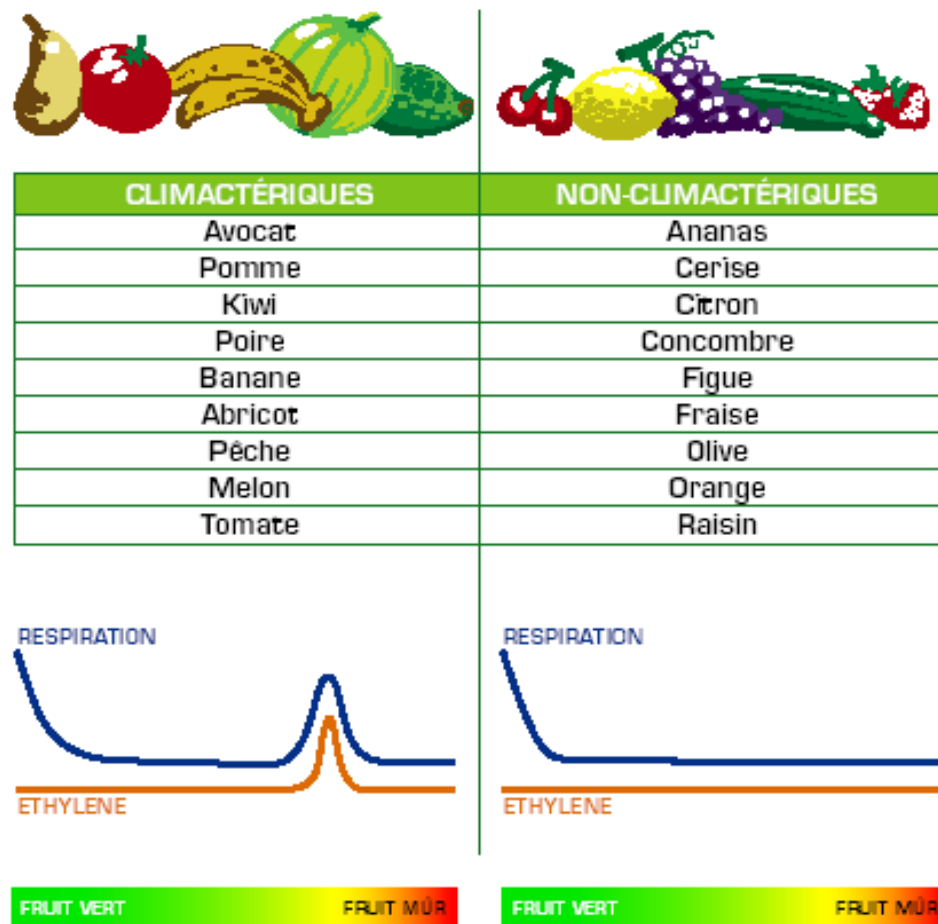


Figure 2. Différenciation entre fruits climactériques et non climactériques. Les fruits climactériques présentent un pic de respiration et un pic de production d'éthylène au cours de leur développement. Les fruits non climactériques sont insensibles à l'éthylène.

Au départ, le fruit est dur, généralement de couleur verte (chlorophylle), aigre, sans odeur et à la saveur insipide. Au cours de la maturation, de nouvelles enzymes sont produites, dont les amylases qui hydrolysent l'amidon en sucre, réduisant ainsi le goût farineux et augmentant la succulence. De nouveaux pigments, caroténoïdes et anthocyanes sont formés pour donner au fruit sa couleur finale. La chlorophylle est dégradée au moment où les nouveaux pigments s'accumulent. Le fruit accumule également des composés phénoliques, des acides aminés et des vitamines. Des molécules organiques sont réduites en molécules plus petites et volatiles, donnant au fruit son arôme. On observe une dégradation des acides, le fruit passant d'un goût aigre à un goût plus neutre. Enfin, le fruit va subir un ramollissement de sa texture sous l'effet d'enzymes hydrolytiques capables de dégrader les constituants principaux de la paroi cellulaire végétale (Koning R.E., 1994).

2.3.1 Les pigments

Les caroténoïdes constituent un groupe important de pigments, ils font partie des composants essentiels de l'appareil photosynthétique, mais fonctionnent aussi en tant que pigments accessoires. Ils peuvent s'accumuler à de fortes teneurs dans des structures cellulaires particulières, les chromoplastes, et contribuent

ainsi à la couleur des fleurs et des fruits. La maturation du fruit est caractérisée en général par une activation de la voie des isoprénoïdes, ce qui conduit à une accumulation massive de caroténoïdes, comme le β -carotène (précurseur de la vitamine A) et de lycopène chez la tomate (antioxydant donnant au fruit sa couleur rouge) (Bramley *et al.*, 2002). Actuellement, l'ensemble de la voie métabolique a été élucidé et nombre de gènes ont été caractérisés. D'autres facteurs tels la lumière, la température, et la disponibilité en éléments essentiels peuvent également affecter le processus d'accumulation de caroténoïdes pendant le développement des fruits. Diverses expériences ont pu être réalisées, entre autres les traitements en sucrose qui accélèrent l'acquisition de couleur et mènent à une accumulation préférentielle de lycopène. L'effet du sucrose pourrait s'expliquer par le changement de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de caroténoïdes. Chez les agrumes comme le citron, la transition de vert à orange ou jaune est due à la conversion des chloroplastes en chromoplastes. Lors de ce processus, la chlorophylle et les membranes photosynthétiques sont dégradées tandis que les caroténoïdes s'accumulent. L'activation d'une phytoène synthase serait la première étape de la caroténogénèse. Lorsque le processus de conversion doit se produire il y a épuisement d'azote et accumulation de sucrose. Ce changement de couleur serait régulé par des hormones. Ainsi, l'éthylène est connu pour accélérer la dégradation de la chlorophylle en activant la transcription de chlorophyllases, alors que les gibbérellines contrecarrent ce phénomène (Tucker *et al.*, 1993).

2.3.2. Les changements de flaveur du fruit

La perception de flaveur relie deux sens, le goût et l'odeur. La flaveur d'un fruit va dépendre des interactions complexes de sucres, d'acides organiques, de composés phénoliques et de substances volatiles.

2.3.2.1. L'assimilation de sucres et d'acides organiques

Les fruits diffèrent par leurs quantités relatives en sucres et acides. Ces molécules sont requises comme substrat de la respiration et proviennent des réactions de photosynthèse. Le glucose, le fructose et le sucrose constituent les principaux sucres, tandis que le malate et le citrate constituent les principaux acides organiques. Le fruit vert est capable de réaliser la photosynthèse, mais celle-ci est limitée, la majeure partie de celle-ci étant réalisée par le reste de la plante. Le carbone peut être stocké sous forme d'amidon, comme chez la banane, ou sous forme de sucre comme chez la tomate. Les fruits continuent d'accumuler des sucres durant leur maturation. Les quantités peuvent être parfois très importantes chez certains fruits, c'est le cas du raisin par exemple. En général, le niveau d'acides organiques diminue durant le mûrissement, probablement dû à leur assimilation en tant que substrat de la respiration.

2.3.2.2. Les composés volatils

Une grande partie sont formés de molécules relativement simples, qui une fois volatiles, ajoutent au fruit son arôme. Il existe néanmoins quelques molécules complexes. Les composés volatils sont présents dans le fruit en quantité faible. La nature de ces composés volatils est très diverse et inclut les alcools, les esters, les aldéhydes et beaucoup d'autres molécules. Cette diversité empêche d'attribuer un rôle précis à un composé particulier dans le développement de la flaveur du fruit.

2.3.3. Le ramollissement de la paroi : implication enzymatique

Les propriétés mécaniques des tissus sont déterminées par la composition en polymères de la paroi cellulaire végétale ainsi que par leurs interactions physicochimiques. Mais lors de la maturation du fruit, la paroi végétale va subir des modifications profondes et rapides conduisant à la fragilisation des tissus du fruit.

L'action de diverses enzymes hydrolytiques sur les polysaccharides de la paroi cellulaire végétale est responsable de la perte d'intégrité de celle-ci et donc du ramollissement du fruit. Cette hydrolyse de la paroi mène à la déstructuration des cellules et des tissus du fruit. Même si cette désorganisation des cellules est considérée comme la cause principale des changements dans la texture, d'autres événements sont observés durant le mûrissement, tels la perte d'adhésion entre ces cellules et les changements de pression osmotique, qui contribuent aussi significativement au ramollissement du fruit. La structure de la paroi devient fortement hydratée et la cohésion du gel de pectine change. Le pH de la paroi varie également, diminuant dans l'espace apoplastique où l'on observe une augmentation de la concentration en ions (Almeida et Huber, 1999). La

maturation est souvent accompagnée d'une réduction de la turgescence, due à une augmentation de la concentration en solutés dans la paroi cellulaire (Shackel *et al.*, 1991).

Le ramollissement peut également avoir pour cause la dépolymérisation du réseau hémicellulosique. Ce phénomène serait le résultat de l'hydrolyse enzymatique du xyloglucane, qui est le composant majeur de cette fraction. Les endoglucanases s'attaquent aux liaisons glycosidiques β -1,4 des xyloglucanes. Les expansines interviennent également dans la modification du réseau xyloglucane/cellulose. Il existerait donc une activité synergique entre expansine et endoglucanase.

Les activités relatives des enzymes hydrolytiques diffèrent suivant les espèces. Par exemple, chez la tomate (*Lycopersicum esculentum*), un des fruits les plus étudiés, une quantité relativement élevée de polygalacturonases s'accumule durant le mûrissement (Woolley, 2001). Chez les fruits, le ramollissement tardif et la détérioration tissulaire sont souvent associés à un désassemblage des pectines de la paroi cellulaire dans les stades tardifs de la maturation, avec une dégradation du fruit dans les derniers stades.

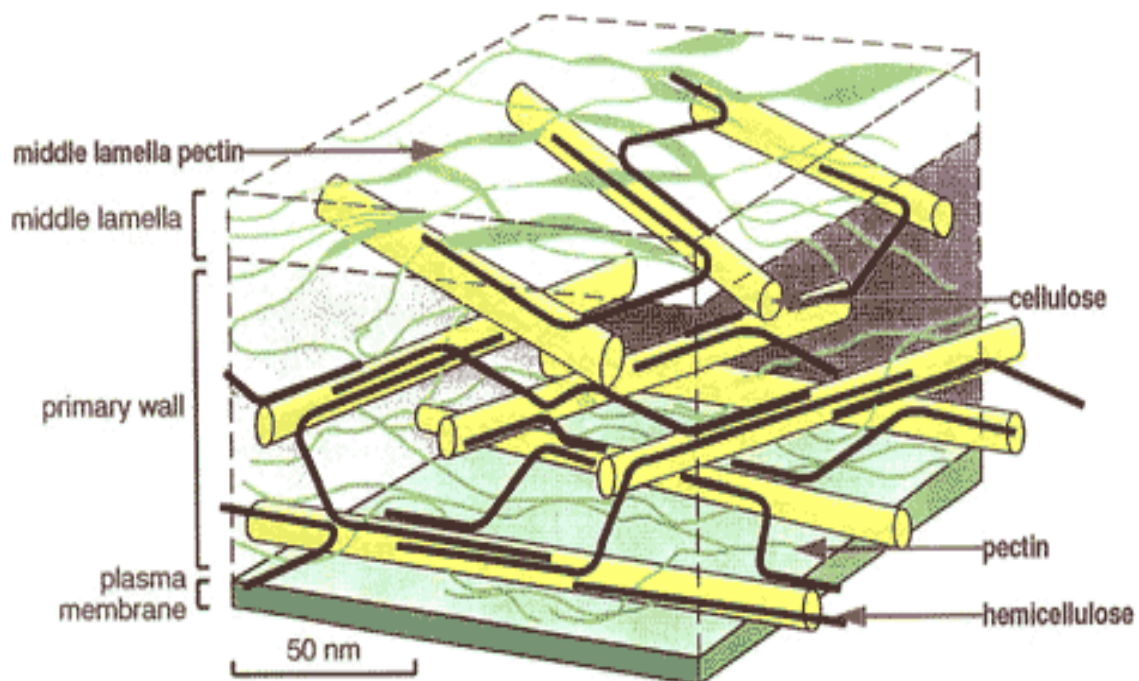


Figure 3. Structure de la paroi cellulaire végétale. On distingue les microfibrilles de cellulose avec lesquelles interagissent les fibres d'hémicelluloses et le réseau pectique.

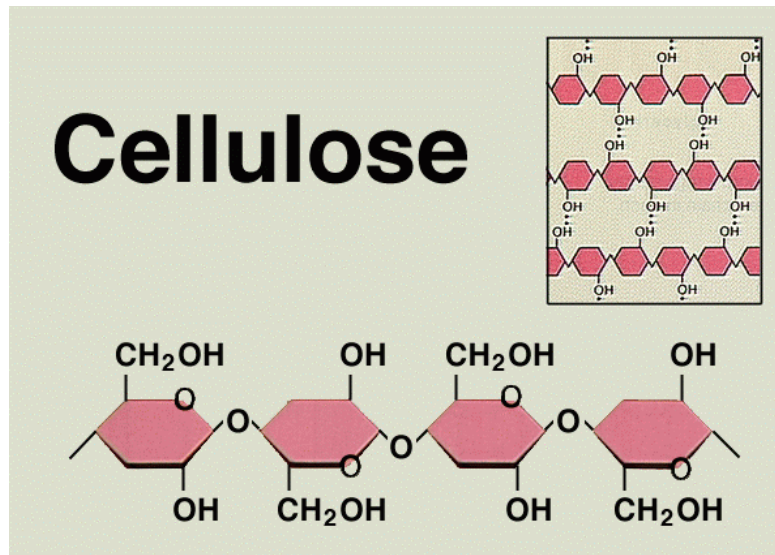


Figure 4. Structure primaire de la cellulose. Celle-ci est formée de résidus glucose, liés en β -1,4. La cellulose constitue la majeure partie des parois cellulaires végétales.

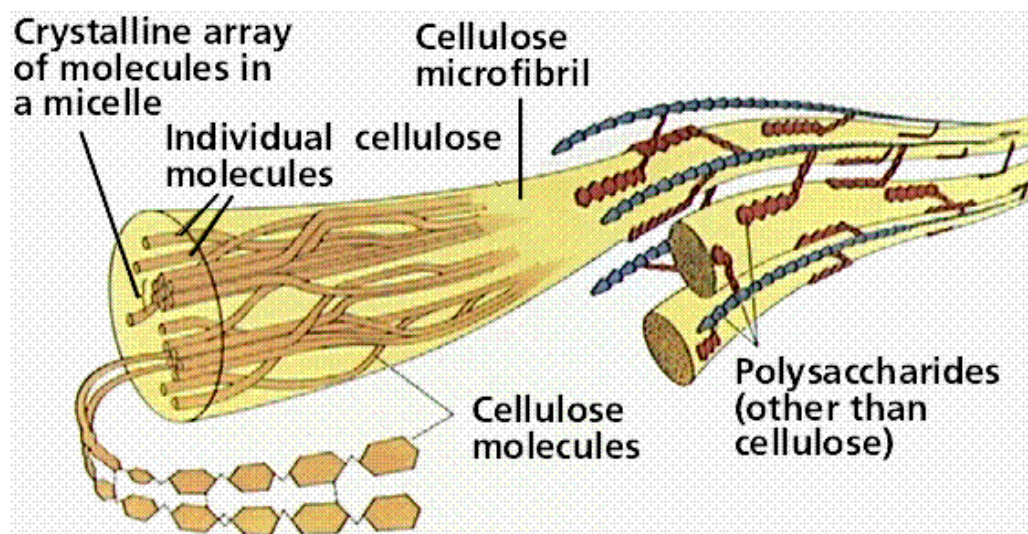


Figure 5. Représentation schématique de la structure des microfibrilles de cellulose et l'agencement des fibres dans la paroi végétale. Ces chaînes ont la propriété de former des rubans plats parallèles et de même polarité qui s'associent très précisément grâce à des ponts hydrogènes pour former des microfibrilles cristallines.

2.4. La paroi cellulaire végétale

Les polysaccharides de la paroi constituent une matrice extracellulaire plus ou moins compacte autour de chaque cellule végétale. La cellulose, les hémicelluloses et les pectines sont les trois composants principaux de la paroi cellulaire végétale (Carpita *et al.*, 1993). En plus de ceux-ci, la paroi cellulaire des végétaux compte au moins une centaine de protéines différentes. La plupart sont considérées comme des protéines de structure, d'autres participant à la synthèse et au remodelage de cette paroi (Cassab, 1998). Ces molécules interagissent pour donner à la paroi cellulaire ses propriétés d'élasticité et de structure.

La disposition et les modifications des constituants de la paroi cellulaire végétale jouent un rôle important durant la croissance et le développement de la plante, la réponse de la plante à l'environnement et les interactions des plantes avec les symbiotes et les pathogènes.

La paroi est constituée de plusieurs couches déposées au cours de la croissance de la cellule. La lamelle mitoyenne constitue la première couche saccharidique déposée juste après la division des cellules. La paroi primaire se dépose durant la croissance cellulaire (figure 3). Elle doit être à la fois stable mécaniquement et suffisamment élastique pour permettre l'expansion cellulaire. La paroi secondaire quant à elle est déposée en fin de croissance cellulaire chez les cellules différenciées. Elle confère une stabilité pour des types de cellules bien spécifiques, comme les éléments du xylème et les cellules du sclérenchyme. Cette paroi est composée elle aussi de cellulose et hémicellulose et est souvent imprégnée de lignine.

2.4.1. La cellulose

La cellulose est une chaîne linéaire résultant de la polymérisation en β -1,4 de plusieurs milliers de résidus glucose (figure 4). Le degré de polymérisation varie entre 500 et 2500-4500 unités dans certaines parois primaires et jusqu'à plus de 14000 dans les parois secondaires.

Ces chaînes ont la propriété de former des rubans plats parallèles de 10 nm sur 5 nm en section transversale et de même polarité qui s'associent très précisément grâce à des ponts hydrogènes pour former des microfibrilles cristallines (figure 5). Ces microfibrilles sont entourées de chaînes de cellulose moins bien agencées. La structuration des microfibrilles de cellulose entre elles, est réalisée par des interactions avec certaines molécules d'hémicellulose via des ponts hydrogènes (Rose et Bennett, 1999).

La synthèse est réalisée grâce à des structures en rosette, appelées complexes terminaux, constituées de 6 sous-unités formant une structure hexagonale ancrée dans la membrane plasmique. Reiter (2002) propose que ces 6 sous-unités soient composées d'une 1,4- β -D-Glucane synthase. Chacune de celle-ci formant une simple molécule de glucane à partir d'UDP-D-glucose cytoplasmique. Les chaînes de 1,4- β -D-glucane émergent vers le côté apoplasmique de la membrane plasmique où elles s'assemblent en microfibrilles de cellulose. L'agencement des microfibrilles dans la paroi est réalisé sous l'influence du cytosquelette. L'orientation est tout d'abord transversale par rapport à l'axe principal de la cellule puis progressivement passe de transversal à longitudinal (Taylor *et al.*, 2000).

2.4.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses forment un groupe hétérogène de polysaccharides branchés, défini actuellement comme n'étant ni de la cellulose, ni de la pectine. Elles sont formées principalement par la polymérisation β -1,4 de résidus glycosyls d'où peuvent partir de courtes chaînes formées d'autres sucres. Le type d'hémicellulose diffère suivant le stade de développement du tissu, l'espèce étudiée ou le type cellulaire observé. Les xyloglucanes et les xylanes constituent les types principaux d'hémicellulose rencontrés dans les parois.

Les xyloglucanes (figure 6), présents essentiellement chez les dicotylées sont formés d'un squelette de 1,4- β -D-glucane portant généralement des résidus 1,6- α -D-xylose sur 3 résidus glucose consécutifs. Le troisième résidu xylose peut porter un D-galactose lié en β -1,2, celui-ci étant habituellement substitué par un L-fucose en α -1,2 (Perrin *et al.*, 1999).

Les xylanes (figure 6) constituent le deuxième type principal d'hémicellulose. Ils sont les plus abondants dans la paroi primaire des monocotylées. Le squelette de la molécule est formé de résidus xylose liés en β -1,4. Des chaînes latérales d'arabinose peuvent substituer en position C3 ou C4 les xyloses de la molécule principale. Ces xylanes fortement branchées sont très hydrophiles, les autres plus hydrophobes s'associent plus à la cellulose.

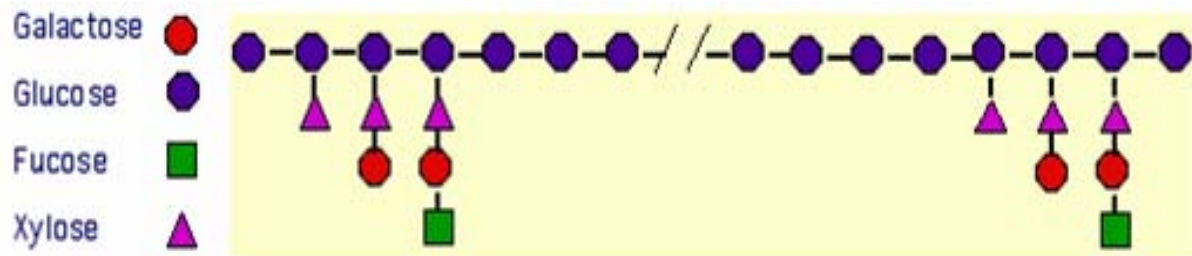


Figure 6. Structure moléculaire des hémicelluloses. Ces polysaccharides sont composés de deux principaux types de molécules. Les xyloglucanes sont formés d'un squelette de 1,4- β -D-glucane portant généralement des résidus 1,6- α -D-xylose sur 3 résidus glucose consécutifs. Le xylane est formé de résidus xylose liés en β -1,4, substitué de différentes chaînes latérales.

Il existe également d'autres types de molécules assimilées aux hémicelluloses, dont les glucomannanes (formés d'un squelette de résidus mannose et glucose liés en β -1,4), les β -(1,3),(1,4)-glucanes ou encore la callose, formée de résidus glucose liés en β -1,3.

2.4.3. Les pectines

Les pectines sont les polymères anioniques prédominants dans la paroi primaire des dicotylédones et des monocotylédones non graminacées. Ce sont des polysaccharides fortement hydratés composés principalement de résidus d'acide D-galacturonique liés en α -1,4. Elles contiennent des régions lisses (les homogalacturonanes), composées d'acides homopolysaccharidiques, non ramifiées, ainsi que des régions hérissées (les rhamnogalacturonanes), formées de blocs de sucres neutres, méthylés, ramifiés et ne pouvant adopter la conformation en boîte à œufs (figure 7) (Visser *et al.*, 1996).

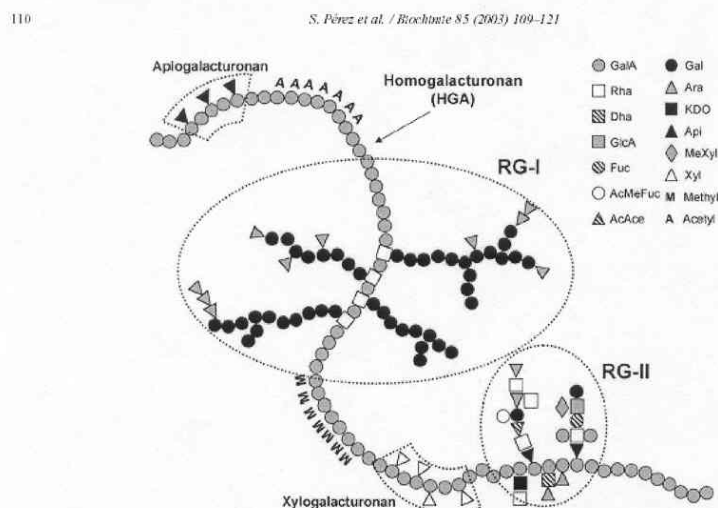


Figure 9. Représentation schématique d'une molécule de pectine. Celle-ci constitue un groupe de polysaccharides fortement hydratés composés principalement de résidus d'acide D-galacturonique liés en α -1,4. Elles est peut être subdivisée en 2 régions distinctes, les régions lisses et les régions hérissées à structure particulière. Au cours de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ce polymère, substrat des PME.

2.4.3.1. Structure des pectines

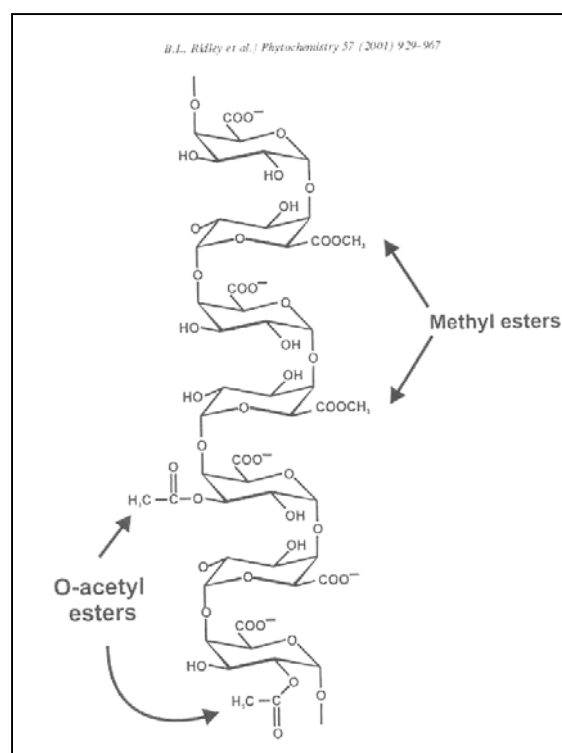


Figure 8. Structure de la molécule d'homogalacturonanes. Celle-ci est formée d'une chaîne linéaire de résidus d'acides galacturonique liés en α -1,4. Certains groupements carboxyles peuvent être méthylés ou O-acétylés.

Les homogalacturonanes (HG) sont formés d'une chaîne linéaire de résidus d'acide galacturonique liés en α -1,4 (figure 8). Le groupement carboxyle de certains résidus peut être méthylestérifié. Suivant l'espèce végétale, ces résidus peuvent également être O-acétylés sur le carbone C3 ou C2. Une propriété majeure de ces composés est de pouvoir s'associer coopérativement en présence de cations bivalents tel le Ca^{2+} , et de former alors un réseau rigide lorsque le degré de méthylation est inférieur à 30 ou 50 %. Cette structure est décrite comme étant le modèle en « boîte à œufs ». Les charges positives des cations en solution neutralisent les charges négatives des acides carboxyliques des pectines, permettant alors l'association de molécules pectiques (Figure 9). Il s'agit d'un processus coopératif car la fixation d'un premier ion Ca^{2+} entre deux chaînes données entraîne un alignement partiel de ces chaînes, favorisant la liaison d'un second, et ainsi de suite. La polymérisation induit un processus de gélification. La stabilité n'est acquise qu'en présence de chaînes dont le degré de polymérisation est supérieur ou égal à neuf acides galacturoniques, séquestrant donc 5 ions calcium (Liners *et al.*, 1992). La propriété de chélation préférentielle des cations bivalents est particulièrement importante car elle contribue à la stabilité de la paroi : la pectine fixe les constituants polysaccharidiques entre eux en formant un réseau tridimensionnel de pectine. Lors de processus particuliers, la paroi primaire peut perdre de sa stabilité et de sa résistance en échangeant les cations bivalents retenus par la pectine contre des protons libérés par le protoplaste (cf. la croissance cellulaire induite par acidification). De plus, toute molécule chargée positivement quelle que soit sa valence, peut se fixer sur les charges négatives de la pectine. Expérimentalement, on a pu démontrer des degrés d'affinité différents pour plusieurs ions bivalent ($\text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$).

Les rhamnogalacturonanes de type I (RG-I) font partie d'une famille de polysaccharides pectiques branchés dont le squelette est formé par une répétition de disaccharides $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-galactosyle-1,2-}\alpha\text{-rhamnosyle-1}\rightarrow$ (figure 10). Les résidus galactosyls peuvent être O-acétylés en position C2 ou C3. Ceux-ci peuvent être également méthylestérifiés. Une majorité des résidus rhamnosyls sont substitués en position C4 par des chaînes latérales formées de sucres acides ou neutres. Ces chaînes latérales contiennent principalement des résidus d' α -D-arabinofuranosyle et/ou β -D-galactopyranosyle (Ridley *et al.*, 2000).

Les rhamnogalacturonanes de type II (RG-II), encore appelés galacturonanes substitués, sont présents chez toutes les plantes supérieures analysées jusqu'à ce jour. Ils sont formés d'un squelette linéaire comprenant au moins 8 résidus α -1,4 galacturosyls. Quatre chaînes oligosaccharidiques complexes nommées A, B, C et D substituent les résidus du squelette galacturonane (figure 11). Ces chaînes sont constituées de 12 familles différentes de résidus glycosyls (figure 12). Les RG-II ont une faible masse moléculaire (5-10 kDa). Leur propriété principale est la capacité de former des dimères 1,2 borate diol diester en présence de borate (O'Neill *et al.*, 1996) (figure 13). Ces dimérisations permettraient la liaison entre molécules différentes de pectines et constitueraient un réservoir de borate pour la plante. On a pu démontrer que les jus de fruits contenaient de fortes quantités de RG-II (20 à 150 mg/l). On attribue d'ailleurs à ce type de polysaccharide une activité immunodominante, ce qui pourrait mener à un intérêt dans la nutrition et la santé humaine.

Enfin les xylogalacturonanes (substitution d'un acide galacturonique en C3 par un ou deux résidus β -D-xylosyle), ainsi que les apiogalacturonanes (substitution d'un acide galacturonique en C2 ou C3 par un ou

plusieurs résidus β -D-apiofuranosyles) sont des structures plus rarement représentées au niveau des molécules pectiques.

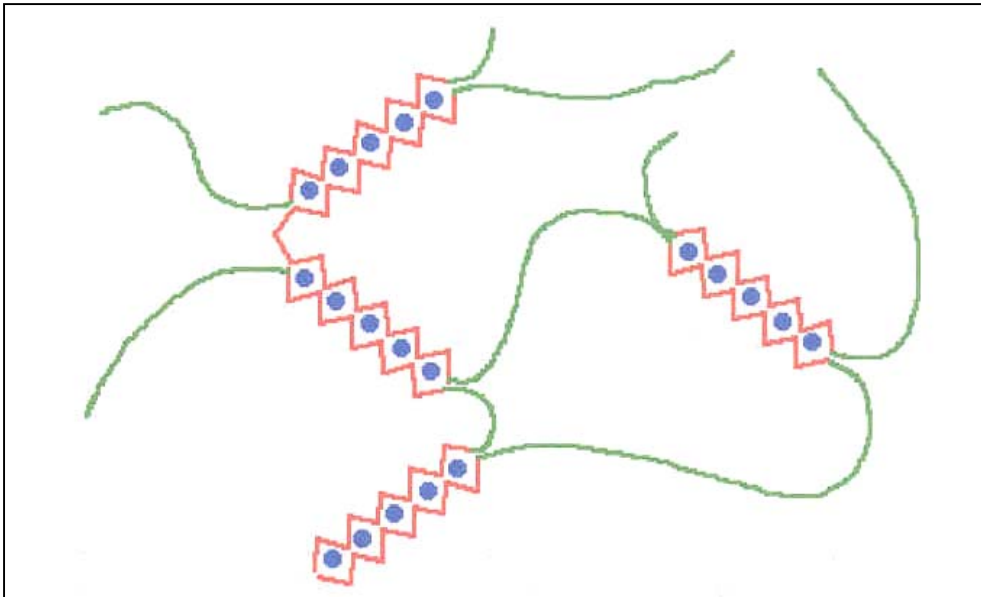


Figure 9. Représentation de la structure en « Egg-box » des chaînes de pectines et association intermoléculaire. Les molécules d'homogalacturonane ont la propriété de pouvoir s'associer coopérativement en présence de cations bivalents tel le Ca^{2+} , et de former alors un réseau rigide. Les charges positives des cations en solution neutralisent les charges négatives des acides carboxyliques des pectines, permettant alors l'association de molécules pectiques et former ainsi cette structure particulière.

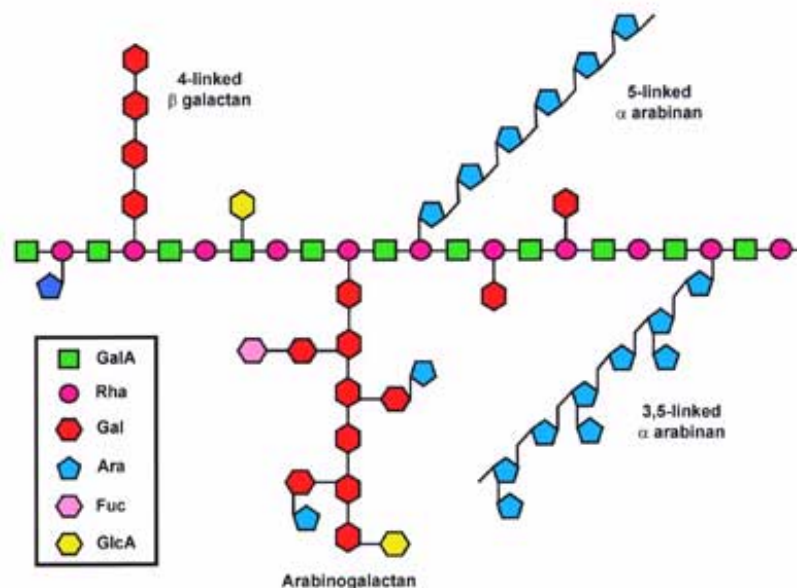
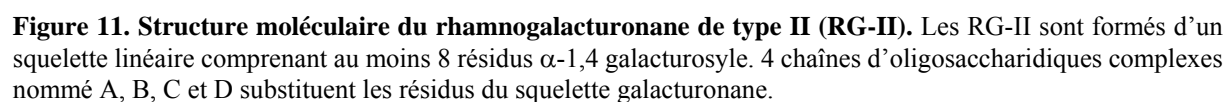


Figure 10. Structure moléculaire du rhamnogalacturonane de type I (RG-I). Ce groupe de pectines sont des polysaccharides pectiques branchés dont le squelette est formé par une répétition de disaccharides $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-galactosyle-1,2-}\alpha\text{-rhamnosyle-1}\rightarrow$. La plupart des résidus rhamnosyles sont substitués en position C4 par des chaînes latérales formées de sucres acides ou neutres.



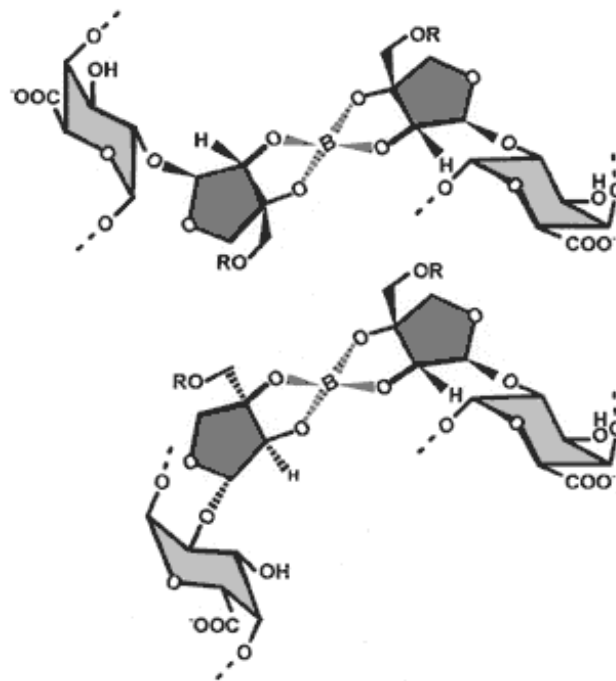


Figure 13. Représentation moléculaire de la dimérisation du rhamnogalacturonane de type II avec des ions borates. Une des propriétés du RG-II est la capacité de former des dimères 1,2 borate diol diester en présence de borate. Ces dimérisations permettraient la liaison entre molécules différentes de pectines.

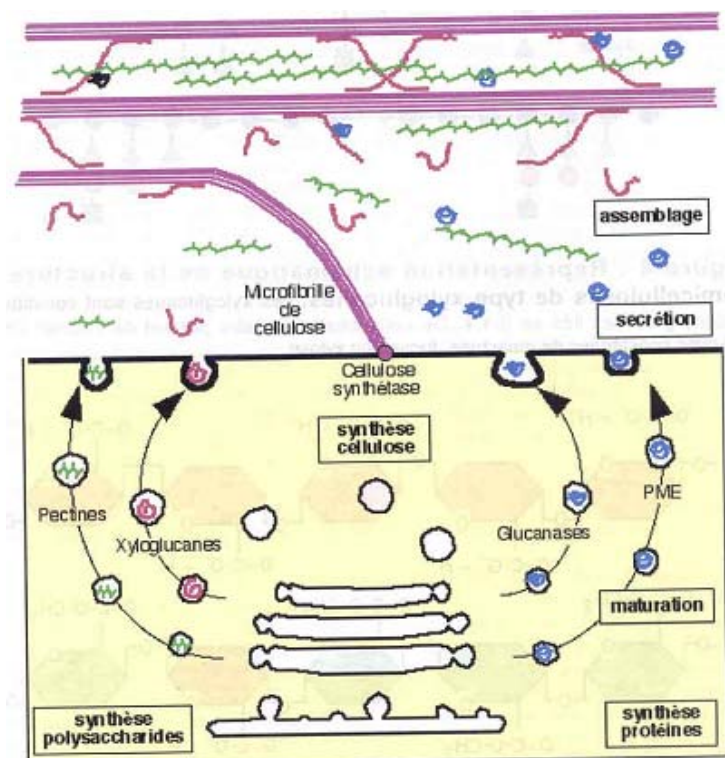


Figure 14. Synthèse et sécrétion des molécules de pectines. Leur synthèse débute dans la partie *Cis* du Golgi, il y a ensuite méthylation des résidus galactosyles dans le Golgi médian et enfin la substitution des différentes chaînes latérales au niveau *Trans* du Golgi. Elles sont alors sécrétées dans la paroi sous forme hautement méthylées. 2.4.3.2. *Synthèse des pectines*

Les pectines sont des molécules complexes nécessitant l'action de plusieurs enzymes, parmi lesquelles figurent des NDP-ose synthases (pour la synthèse des molécules de base de la chaîne pectique), des glycosyltransférases, des méthyltransférases ou encore des acétyltransférases. On sait depuis longtemps que les pectines sont polymérisées dans le Golgi. Leur synthèse débute dans la partie cis du Golgi, puis se poursuit par la méthylestérification des résidus d'acide galacturonique dans le Golgi médian et enfin elles peuvent être substituées de différentes chaînes latérales au niveau trans du Golgi. Ces pectines sont alors sécrétées dans la paroi sous forme hautement méthylées (Carpita *et al.*, 1993) (figure 14). Le caractère acide des pectines détectées dans les parois provient donc de l'activité d'enzymes pariétales.

En ce qui concerne la synthèse des pectines, les substrats NDP-oses seraient synthétisés au niveau du cytosol par les NDP-ose synthases. Ils seraient ensuite transportés via un antiport (NDP-ose : nucléoside monophosphate) à travers la membrane du Golgi où ils seraient utilisés comme substrat par une glycosyltransférase greffant ce résidu sur une chaîne polysaccharidique acceptrice. Enfin, le nucléoside diphosphate séparé du résidu glycosyl serait dégradé en phosphate inorganique et nucléoside monophosphate, ce dernier pouvant agir au niveau du transporteur.

2.4.4. Les principales enzymes hydrolytiques

Les cinq principales classes d'enzymes impliquées dans le processus de modification de la paroi cellulaire végétale sont les endo-1,4- β -glucanases, les expansines, les polygalacturonases, les pectate lyases et les pectines méthylestérases.

Les endo-1,4- β -glucanases, communément appelées cellulases, hydrolysent les liens β -1,4 des hémicelluloses. Elles sont aussi capables de dégrader la cellulose non cristalline. Elles appartiennent à une famille multigénique et on les retrouve chez différents organismes comme les végétaux, les champignons, les bactéries et certains insectes. Ces enzymes sont impliquées dans les phénomènes d'expansion cellulaire, d'abscission et de maturation du fruit (Harpster *et al.*, 1998).

Les expansines interviennent dans le clivage des ponts hydrogènes formés entre les différentes molécules du réseau tridimensionnel de la paroi cellulaire végétale. (Harrisson, 2001). Elles sont généralement exprimées dans des tissus en croissance.

Les polygalacturonases (PG) hydrolysent le lien α -1,4 des molécules homogalacturoniques. Deux types de PG se différencient par leur mode d'action. Les endopolygalacturonases hydrolysent au hasard tout au long de la molécule pectique. Les exopolygalacturonases enlèvent à la molécule pectique un résidu galacturosyl depuis son extrémité non réductrice. Les polygalacturonases peuvent hydrolyser le lien glycosidique entre deux acides galacturoniques proches d'un résidu possédant un groupement carboxyle libre. Ce qui implique qu'une pectine hautement méthylée ne pourra pas ou difficilement être dégradée par les PG. L'action des pectines méthylestérases est donc nécessaire préalablement à l'activité des PG (Redondo Nevado *et al.*, 2001).

Les pectate lyases agissent également au niveau des liaisons α -1,4 des molécules homogalacturoniques. Elles catalysent le clivage de ce lien glycosidique par β -élimination. Il en résulte la formation d'une double liaison entre les carbones 4 et 5 d'un des résidus galacturosyls. De même que pour les PG, on distingue les endo et les exopectate lyases, et l'action préalable des PME est nécessaire (Marin-Rodriguez *et al.*, 2002).

Enfin, les pectines méthylestérases, les enzymes de la paroi auxquelles nous nous sommes intéressés, font l'objet du chapitre suivant.

2.5. Les Pectines méthylestérases

Les pectines méthylestérases (PME) catalysent la déméthylestérification des résidus d'acide galacturonique méthylés des molécules de pectine. Les produits de réaction sont une pectine acide et du méthanol (figure 15). Ces enzymes sont impliquées dans des processus de développement importants comme l'adhésion cellulaire et l'élongation. Elles sont aussi impliquées dans les régulations des conditions ioniques et de pH dans la paroi cellulaire.

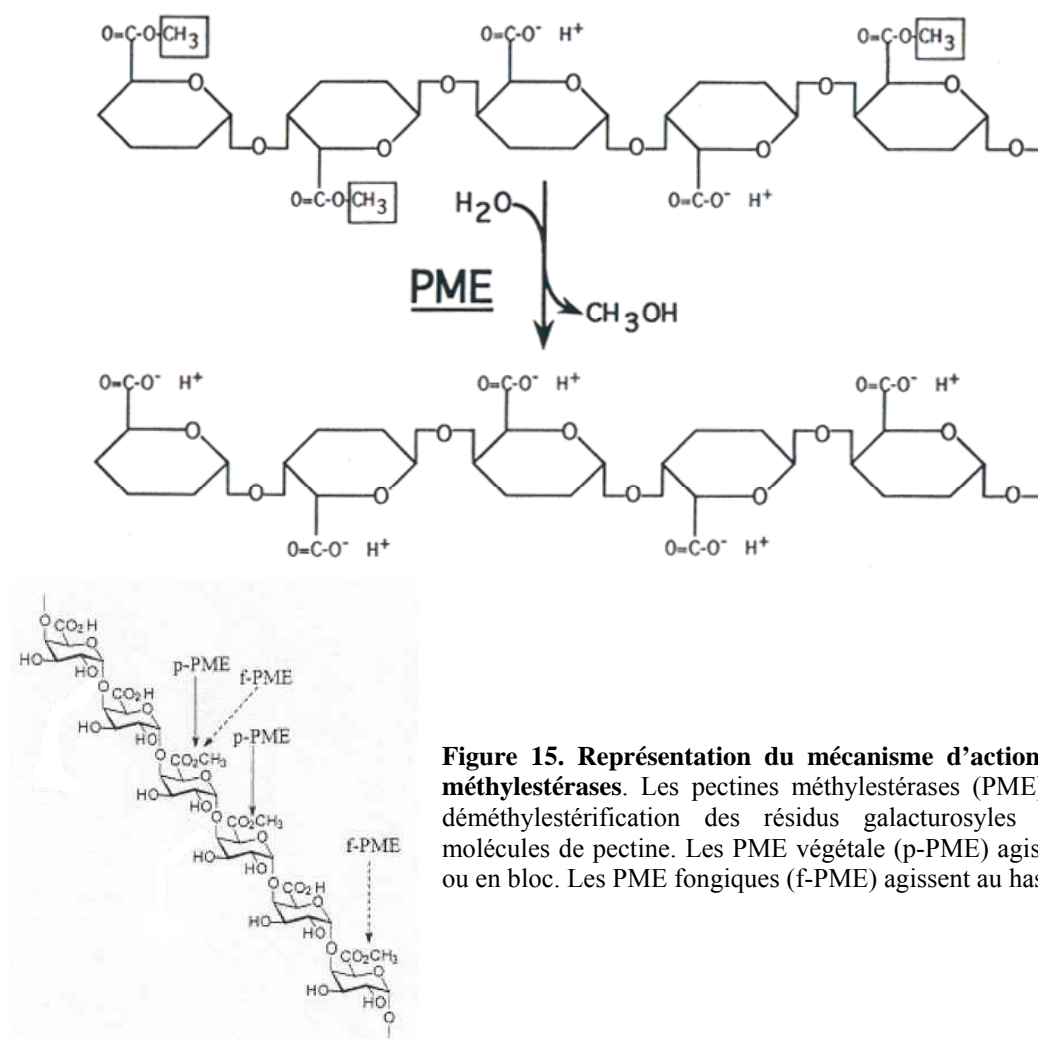
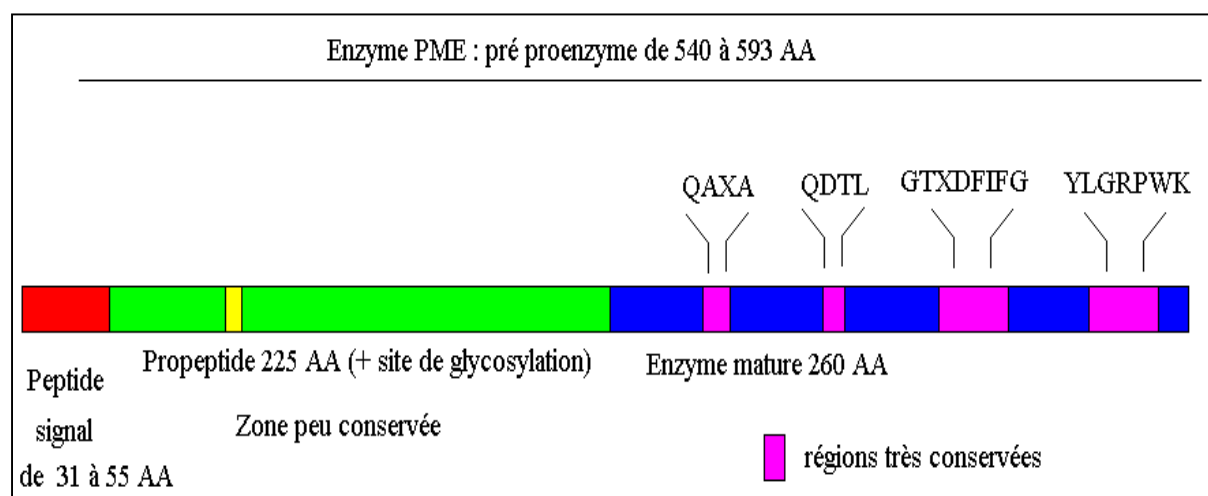


Figure 15. Représentation du mécanisme d'action des pectines méthylestérases. Les pectines méthylestérases (PME) catalysent la déméthylestérification des résidus galacturosyles méthylés des molécules de pectine. Les PME végétale (p-PME) agissent au hasard ou en bloc. Les PME fongiques (f-PME) agissent au hasard.

Figure 16. Modèle de l'enzyme PME. Elles possèdent une séquence signal ainsi qu'une importante extension



amino-terminale en amont d'une séquence correspondant à l'enzyme mature. Ces deux régions sont clivées lors de la maturation de l'enzyme.

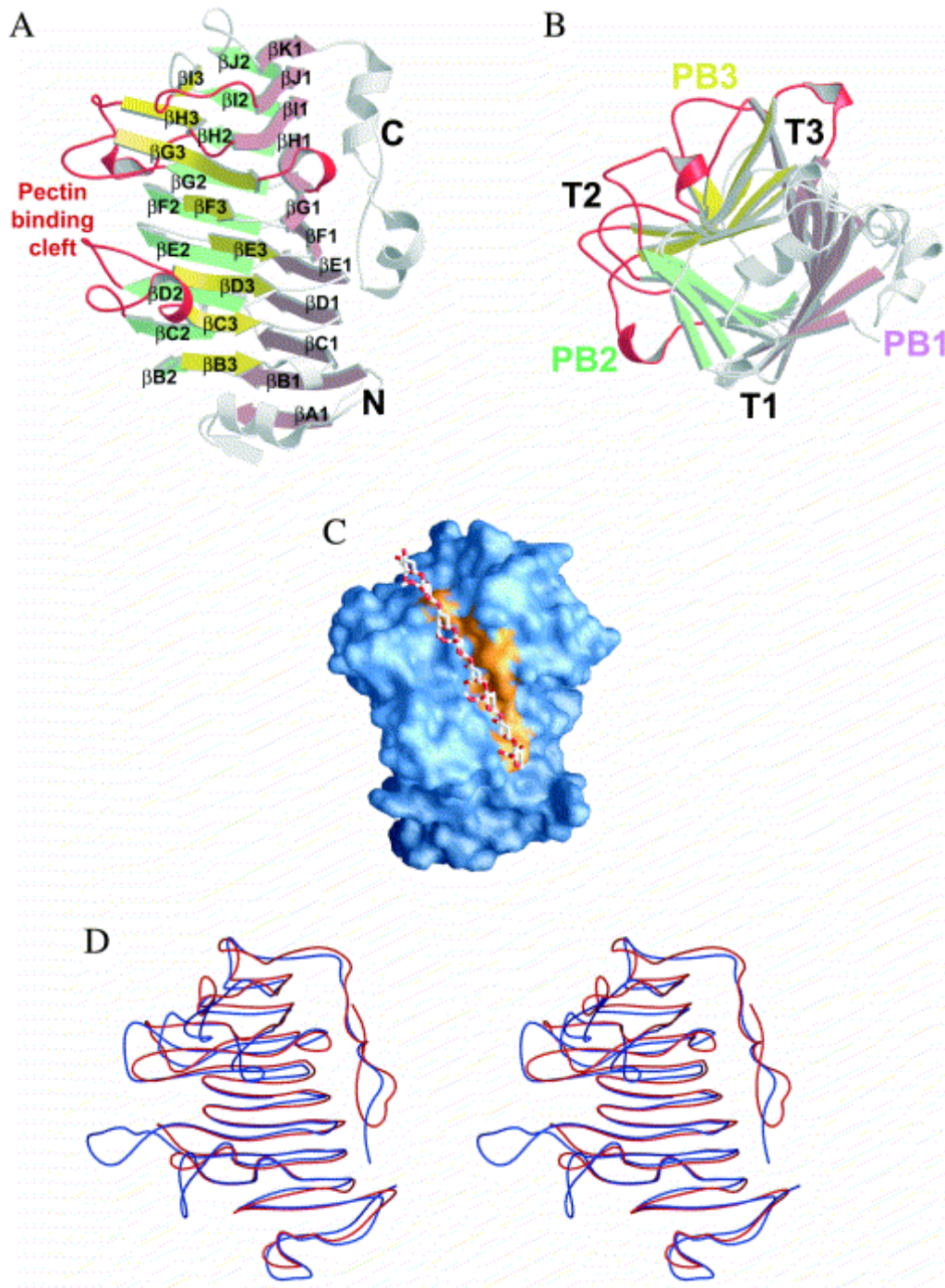


Figure 17. Représentation de la structure cristalline de PME de carotte.2.5.1. Structure des PME

Les PME sont présentes chez toutes les plantes supérieures examinées et sont aussi produites par les espèces fongiques et les bactéries phytopathogènes (Micheli, 2001). Les PME sont encodées par une famille multigénique, dont font partie au moins 67 « PME-like » chez *Arabidopsis*. Les gènes de PME peuvent être divisés en 2 classes. Les PME appartenant à la première classe (PME type I) contiennent seulement 2 ou 3 introns, et un longue « pro région » N-terminale. La deuxième classe (PME type II) englobe les gènes possédant 5 voire 6 introns, avec une « pro région » N-terminale courte ou inexistante. Ce type de PME présente beaucoup d'homologie avec les PME d'organismes phytopathogènes. Actuellement, seul un site de N-glycosylation a été décrit chez les PME.

Si l'on examine l'enzyme au niveau de sa structure primaire, on remarque que les régions N-terminales sont variables en taille et en séquence et montrent de plus un faible niveau d'identité des acides aminés. Par contre la région catalytique C-terminale est beaucoup plus conservée, elle constitue la protéine mature. Les PME sont synthétisées sous forme de pré-pro-enzyme (figure 16). Elles possèdent une séquence signal ainsi qu'une importante extension amino-terminale de 22 kDa en amont d'une séquence correspondant à l'enzyme mature. Ces deux régions sont clivées lors de la maturation de l'enzyme, dont la masse moléculaire varie de 34 à 37 kDa. La pré-région ou peptide signal est requise pour le ciblage de la protéine vers le réticulum endoplasmique. La pro-région consiste en une large protéine (dont la longueur varie entre 250 – 550 résidus acides aminés). Etant donné que seule la protéine mature se retrouve dans la paroi, le peptide signal ainsi que le pro-peptide sont clivés durant la phase de sécrétion de la protéine. Bien que le rôle de cette pré-région soit toujours inconnu, des hypothèses proposent un rôle de chaperones intramoléculaires ou encore d'inhibition de l'activité enzymatique. Ce dernier point permettrait d'expliquer que, malgré la co-synthèse et la co-sécrétion des PME et des pectines dans le Golgi, les pectines sécrétées vers l'apoplasme soient hautement méthylées (Gaffe *et al.*, 1994). De plus, la similarité entre ce pro-peptide et un inhibiteur de protéine chez le kiwi conforte cette hypothèse (Giovane *et al.*, 2004).

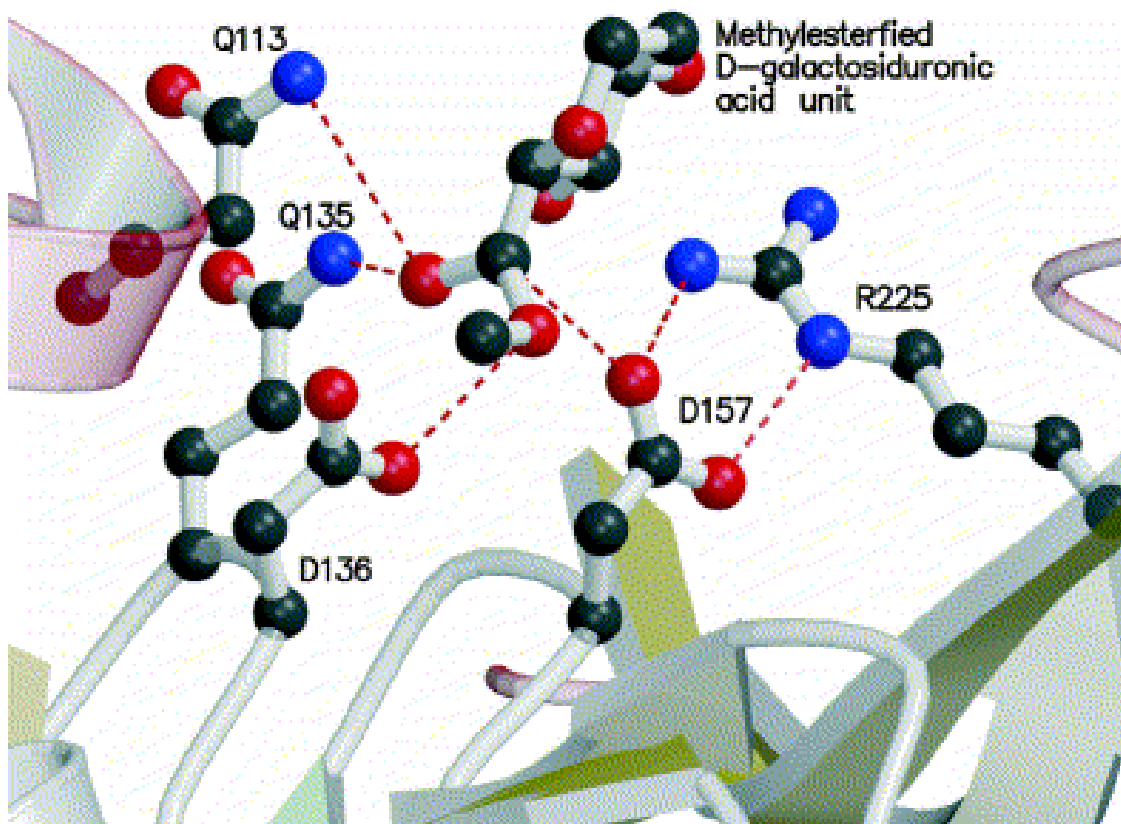


Figure 18. Représentation du site actif de l'enzyme PME. Il est formé de 2 résidus asparagine en son centre, Asp136 et Asp157 et de 2 chaînes de glutamine, Gln 113 et Gln 135, sans oublier 2 résidus aromatiques, phénylalanine et tryptophane

Récemment, une structure cristalline de PME a été caractérisée chez la carotte (*Daucus carota*). Cette enzyme est formée de plans β parallèles en hélice droite, comme dans le cas d'enzymes pectolytiques fongiques et bactériennes (pectate lyase, pectine lyase, polygalacturonase et rhamnogalacturonase). La PME de carotte est formée de 8 tours de β -hélice. La structure en β -prisme est constituée de 3 plans β parallèles, PB1, PB2 et PB3 (figure 17). L'espace interne formé par cette structure hélice- β est essentiellement hydrophobe. Il n'existe pas d'échelle asparagine comme cela avait pu être observé chez les pectate lyases (Yoder *et al.*, 1993). Le site de fixation du substrat, la pectine, est composé principalement de résidus aromatiques, comme le tryptophane et la phénylalanine, qui est une caractéristique propre aux sites de fixation des carbohydrates. En ce qui concerne le site actif, celui-ci est formé de 2 résidus carboxylates en son centre, Asp136 et Asp157 et de 2 chaînes de glutamine, Gln 113 et Gln 135 (figure 18), sans oublier 2 résidus aromatiques. Les PME en hydrolysant les ponts

esters des unités galacturoniques méthylées, produisent un polymère chargé négativement et du méthanol. Ce produit chargé serait alors repoussé par le site actif avec les deux résidus aspartate et deux résidus glutamine. Ces interactions entre le polymère pectique et le site riche en résidus aromatiques seraient suffisantes pour maintenir le substrat fixé à l'enzyme pour des réactions multiples (Johansson *et al.*, 2002). Les résidus du site actif sont conservés chez les espèces végétales étudiées et la structure cristalline présente des similitudes importantes avec la structure cristalline de la bactérie d'*Erwinia chrysanthemi*.

2.5.2 Mode d'action des PME

Les PME matures peuvent présenter deux modes d'action distincts (Grasdalen *et al.*, 1996). Le premier mode d'action consiste en la déméthylestérification d'un résidu d'acide galacturonique au hasard sur la molécule pectique. Ce processus appelé « multiple-chain », est le mode d'action principal des PME microbiennes. En effet, le mode d'action principal des PME végétales correspond à une déestérification en bloc. Cette réaction peut être de type « single-chain » (correspondant à une déestérification de tous les résidus estérifiés entourés par deux résidus déestérifiés) ou de type « multiple-attack » (déestérification d'un nombre fixe de résidus dans un bloc estérifié). Lors de ces réactions, le nombre de blocs de groupements carboxyles libres augmente. Ces blocs peuvent alors interagir avec des ions Ca^{2+} , créant ainsi un gel de pectate. Toutefois, les PME végétales réalisent également des déestérifications au hasard dans certaines conditions ioniques et de pH. La déméthylestérification libère des protons qui peuvent activer des enzymes telles que les endopolygalacturonases contribuant ainsi à la dégradation de la paroi cellulaire.

2.5.3. Régulation des PME

La régulation de l'activité des PME est obtenue d'une part par une expression différentielle des isoformes, et d'autre part par des mécanismes post-traductionnels.

Plusieurs isoformes sont exprimées dans les tissus végétaux. Elles peuvent l'être à des moments différents dans un même organe en fonction de l'état physiologique de celui-ci. Elles peuvent être également exprimées dans des tissus différents. La plupart des PME purifiées de plantes ont des points isoélectriques neutres ou alcalins, et sont fixées à la paroi cellulaire végétale via des interactions électrostatiques. Cependant, de plus en plus d'isoformes acides sont détectées dans les fractions solubles des tissus végétaux (Ly-Nguyen *et al.*, 2002).

Ricard *et al.* (1986) ont postulé que l'activité PME dans la paroi cellulaire pouvait être régulée par la concentration en H^+ d'une manière cyclique durant la croissance cellulaire. L'activité optimale de l'enzyme se produit à un pH proche de 7 et est ensuite réduite par une diminution locale du pH générée par les protons relâchés en conséquence de cette réaction. Des enzymes impliquées dans l'extension cellulaire comme les glycosidases et glycosyl-transférases, sont activées par cette diminution de pH. La dilution des charges négatives et l'augmentation du pH local entraînent une réactivation des PME avec le début d'un nouveau cycle. Les PME sont liées de manière ionique à la paroi cellulaire. Ainsi, les variations du pH pariétal vont influencer également les forces de liaison de la pectine à la paroi. De ce fait, une isoforme basique sera chargée positivement à pH acide, augmentant sa liaison à des pectines acides. Par contre, à pH basique, ces mêmes isoformes seront libres dans la paroi où elles pourront catalyser les réactions de déméthylation. De plus, le pH peut aussi influencer le mode d'action des PME. En effet, on trouve dans la littérature des exemples d'isoformes présentant un mode d'action particulier à un pH donné (par exemple au hasard) et un mode d'action différent dans d'autres conditions de pH (par exemple en bloc) (Denès *et al.*, 2000).

Le degré de méthylestérification des pectines va également influencer l'activité de certaines isoformes. En effet, la présence de résidus galactosyls acides sur la pectine est nécessaire pour l'action des PME. Certaines isoformes demandent la présence de ce résidu acide, deux résidus galactosyls en amont de leur site d'action. Par contre, d'autres isoformes seront actives sur un résidu méthylestérifié positionné trois résidus en aval d'un acide galacturonique (Catoire *et al.*, 1998).

Plus récemment, l'existence d'inhibiteurs de PME (PMEI) a été mise en évidence. Ces inhibiteurs peuvent être de différents types et sont présents dans plusieurs espèces de plantes. Chez la pomme de terre par exemple, l'inhibiteur semblerait être de type pectique. Il est détecté dans les extraits purifiés de PME. Il est extrêmement thermostable (résiste à 120°C pendant 10 minutes) et son poids moléculaire se situe aux alentours de 158-232 kDa. Son action inhibitrice a été observée sur des PME d'autres espèces végétales. Par contre, aucun

effet n'a pu être montré avec les PME bactériennes et fongiques (McMillan *et al.*, 1995). Ces inhibiteurs peuvent être également de type protéique comme ceux qui ont pu être caractérisés chez le kiwi. Ils seraient probablement synthétisés sous forme d'un large précurseur dans les premiers stades de développement du fruit, puis seraient activés après clivage protéique durant le processus de mûrissement. Ces PMEI sont actifs contre les PME de plusieurs végétaux (kiwi, orange, pomme, tomate, abricot, banane, carotte et pomme de terre). Ils interagissent directement au niveau du site actif de l'enzyme. La stabilité de ce complexe est fortement influencée par le pH, ce qui indique bien que l'activité PME peut être modulée directement par le pH ou indirectement via de l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme (Giovane *et al.*, 1995).

L'activité PME peut être également régulée par des hormones végétales. Par exemple l'activité PME est induite par l'auxine qui est produite lors de l'élongation cellulaire chez le pois (Yoda, 1954). De même, l'acide abscissique active les PME dans les graines de tomate et les inhibe durant la germination du cèdre jaune, *Chamaecyparis nootkatensis* (Ren *et al.*, 2000).

3. Présentation du matériel végétal : Le fraisier

La fraise, objet de la présente étude, est un fruit dont la consommation est en nette augmentation en Belgique, avec un accroissement des récoltes et des parcelles de cultures (Tableau 1).

Production totale de fraises belges	
Culture sous serres chauffées ou sous tunnel plastique	
1997:	12.500 tonnes
1998:	14.038 tonnes
1999:	17.000 tonnes
2000:	21.450 tonnes
2001:	24.200 tonnes
2002:	25.000 tonnes
Culture de pleine terre	
1997:	23.250 tonnes
1998:	33.962 tonnes
1999:	22.500 tonnes
2000:	21.450 tonnes
2001:	17.100 tonnes
2002:	15.000 tonnes
Superficie totale de fraises belges	
Culture sous serres chauffées ou sous tunnel plastique	
2000:	600 ha
2001:	778 ha
2002:	800 ha
Culture de pleine terre	
2000:	1000 ha
2001:	1265 ha
2002:	1226 ha
D'après le Vlaam Portaal, Office belge d'Agro-marketing http://aardbei.vlam.be/_fr/prodgeg.htm	

Tableau 1. Production de la fraise en Belgique. Ce tableau reprend les superficies cultivées à partir de 2000, de même que la production de fraise en tonnes par an à partir de 1997. Il reprend également les différents modes de culture de fraisier.

3.1. Description générale

Le fraisier est une plante herbacée de la famille des Rosacées. Elle est rustique, de 20 à 30 cm de hauteur, se développant sur un sol légèrement acide (pH de 6 à 6,5) et une fumure riche en matière organique. Le fraisier se présente sous la forme d'une couronne centrale composée de tiges courtes et dressées (les tiges florales et les pétioles). Les feuilles ont trois folioles, sont pétiolées, dentées et parfois velues. Le fruit est utilisé soit en entier comme aliment, soit pressé pour la fabrication de jus, de confiture, de sirop et de vin. Les fruits, les feuilles et les stolons sont aussi utilisés à des fins médicinales. L'espèce moderne, *Fragaria x ananassa*, est la principale espèce cultivée de nos jours.

Au sens botanique strict, la fraise n'est pas un vrai fruit car elle provient du développement des tissus du réceptacle. Le terme correct est ici pseudocarpe. Suivant les espèces de fraisiers, on retrouve une division des sexes, avec des plants mâle ou femelle ou bien ceux-ci sont hermaphrodites. La fleur hermaphrodite est

composée d'étamines et de structures nommées carpelles, insérées dans le réceptacle. Chaque carpelle est composé d'un stigmate, d'un style et d'un ovaire. Lors du développement de la fraise, le réceptacle grossit et prend sa couleur rouge, pour former le fruit tel que nous le connaissons. Ce réceptacle porte sur toute sa surface, les vrais fruits, que l'on appelle les achènes, qui sont les ovaires matures (Brown, 2000).

Le fraisier se multiplie principalement de manière végétative, grâce aux stolons. Ce sont des tiges spécialisées dont le deuxième nœud porte la plante fille que l'on peut aisément transplanter et ainsi propager comme clone.

3.2. Le fraisier moderne : *Fragaria x ananassa*

On dénombre environ 12 espèces de fraisiers originaires principalement du nord des régions tempérées (Eurasie, Amérique du Nord). Le taux de ploïdie varie suivant les espèces. Par exemple, le fraisier sauvage (*Fragaria vesca*) est diploïde ($2n=14$), l'hautbois (*Fragaria moschata*) est une espèce hexaploïde ($2n=42$), de même que le fraisier du Chili (*Fragaria chiloensis*). Le fraisier de Virginie (*Fragaria virginiana*) est octoploïde ($2n=56$) comme le fraisier moderne (*Fragaria x ananassa*).

Le fraisier moderne, qui est actuellement l'espèce presque exclusivement cultivée, est un hybride entre l'espèce domestiquée *Fragaria virginiana* à fleurs hermaphrodites et un plant femelle de la variété Chilienne (*Fragaria chiloensis*). Dans cette espèce, on dénombre différents cultivars qui présentent entre eux des différences au niveau de la morphologie du fruit, de la résistance aux maladies, du nombre de fleurs par inflorescence, de la première date de floraison, de la durée de la floraison... Parmi ces variétés, les plus cultivées en Belgique sont Elsanta, Mara des bois, Darselect. Les variétés de fraisiers modernes peuvent être divisées en deux groupes principaux en fonction du mode d'initiation de la floraison : les variétés non remontantes (« short day ») ne produisent qu'une seule fois dans l'année. Toutefois leur production est abondante au printemps. Par exemple, la variété "Gariguette" fait partie de ce premier groupe. En ce qui concerne les fraisiers appartenant au deuxième groupe (« long day » ou « day neutral »), c'est-à-dire les variétés que l'on appelle remontantes, elles produisent en juin - juillet, puis d'août aux premières gelées. Toutefois les productions lors de chaque floraison sont plus faibles que pour les variétés non remontantes. Les variétés « Mara des bois » et « Calypso » font partie de ce second groupe.

La culture du fraisier en Europe débute au 14^{ème} siècle avec la culture du fraisier des bois *Fragaria vesca*. Jusqu'au 18^{ème} siècle, seules trois espèces étaient cultivées, le fraisier des bois, le fraisier de Virginie et le fraisier hautbois. En 1714, Amédée-François Frezier introduit la fraise du Chili en Europe. Les croisements accidentels entre cette espèce et le fraisier de Virginie ont donné un hybride à gros fruits et aux tolérances climatiques plus importantes : la fraise moderne. A partir de ce moment, la culture de cette espèce hybride a supplanté celle des autres espèces jusqu'alors cultivées (Sauer, 1993). Au cours du 18^{ème} siècle, Duchesne a caractérisé de nombreuses espèces de fraisiers ainsi que l'hybride. Il a mis en évidence le fait que les plants ramenés du Chili (en réalité tous femelles) sont les plants mères, tandis que l'espèce de Virginie (hermaphrodite) est le « père ».

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à une variété plus récente, Calypso, qui présente comme particularité une floraison abondante et une production de fruits importante. Mais nous avons surtout choisi cette variété car elle présente un intérêt au niveau de son utilisation pour la transgénèse, car son taux de régénération après transformation est nettement supérieur à celui des autres variétés étudiées (Passey *et al.*, 2003) (figure 19).

3.3. Développement et maturation de la fraise

Le développement de la fraise est généralement divisé en plusieurs stades distincts. On retrouve tout d'abord le stade de croissance du fruit vert (G = Growing), lui-même divisé en 3 sous stades : fruit vert de petite taille (G1), fruit vert de taille moyenne (G2) et fruit vert de taille finale (G3). Vient ensuite le stade fruit blanc (W = White) au cours duquel la chlorophylle est dégradée et la synthèse de pigments commence. On subdivise ce stade en stade W1 (lorsque les achènes sont encore en maturation) et stade W2 (les achènes sont à maturité). Le stade suivant, Turning (T), est celui où le fruit subit de nombreux changements comme le développement de la coloration et le début de son ramollissement. Et enfin, on distingue encore le stade fruit rouge (R = Ripe),

stade de maturité du fruit (figure 20). Cependant un dernier stade dit « over ripe » est encore cité et correspond au fruit sénescant.

Explant	Cultivar ^a						
	Calypso	Pegasus	Elsanta	Bolero	Tango	Emily	Eros
Leaf disc	100±0.0a	96±0.03c	2±0.0a	58±0.06a	100±0.0c	70±0.06a	0
Petiole	42±0.06b	56±0.06c	4±0.0a	38±0.06c	92±0.04c	92±0.04a	0
Stipule	60±0.06b	68±0.06c	0	36±0.06a	98±0.02c	60±0.06d	0
Root	62±0.06b	64±0.06c	2±0.0d	8±0.06d	68±0.06c	98±0.02d	8±0.0d

Figure 19. Taux de régénération de plantules en culture *in vitro* de différents cultivars de fraisier. Des plantules ont été régénérées de différentes variétés de fraisiers et d'explants (Passey et al., 2003)



Figure 20. Les différents stades de développement de la fraise. Celui-ci débute par la croissance et le développement du fruit vert (la chlorophylle est toujours présente), puis vient alors le stade blanc où la synthèse de pigments anthocyane va débiter. Le fruit passe alors au stade rouge et rouge avancé, c'est à dire où le fruit est mûr.

3.3.1. Le rôle de l'auxine dans le développement de la fraise

En 1950, Nitsch a mis en évidence le rôle essentiel des achènes dans la croissance du réceptacle. Ceux-ci sont responsables de la production, jusqu'à leur maturité, d'une hormone végétale, l'auxine. Celle-ci, produite par les achènes, active le développement et la croissance du réceptacle. La dé-achénation d'un fruit vert en cours de croissance retarde son développement. L'auxine produite par les achènes inhibe également les processus de

maturation de la fraise (figure 21). En effet, un fruit blanc (lorsque les achènes ne sont pas encore matures) dé-achéné, montrera une accélération de sa coloration et de son ramollissement. De plus, en 1988, Given et ses collègues ont montré que l'application d'auxine synthétique retardait la maturation d'un fruit intact et inhibait l'accélération du mûrissement chez un fruit dont les achènes avaient été ôtés. Ces observations indiquent donc que l'expansion du réceptacle dépend d'un apport continu en auxine produit par les achènes. Une fois ceux-ci à maturité, ils ne produisent plus d'auxine et la maturation du fruit peut être mise en route.

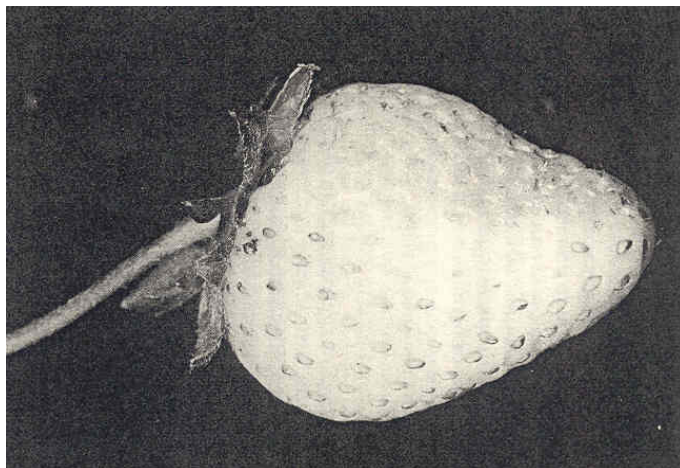


Figure 21. Effet de l'auxine sur la maturation du fruit. L'auxine produite par les achènes, active le développement de la croissance du réceptacle. La dé-achénation d'un fruit vert en cours de croissance retarde son développement (face supérieure du fruit).

Manning (1994) a mis en évidence l'expression de nouveaux ADNc au cours de la maturation de la fraise ainsi que l'influence de l'auxine sur leur régulation. Par l'observation de changements dans la quantité de transcrits ARNm, lors des étapes allant d'un fruit vert à un fruit rouge, celui-ci (1998) a pu mettre en évidence 26 familles d'enzymes spécifiques de la maturation. Les fonctions putatives de ces séquences ont été caractérisées par homologie avec des banques de données. Ces enzymes sont impliquées dans des voies métaboliques en relation avec la couleur, la texture, la respiration, la composition en carbohydrates et la saveur du fruit. La plupart de ces gènes sont régulés négativement par l'auxine.

3.3.2. Les modifications pigmentaires

Certaines enzymes impliquées dans la synthèse d'anthocyanes font partie de ces ADNc : la chalcone synthase, la chalcone reductase, la flavonoïde-3-hydroxylase, la O-méthyltransférase et 2 UDP dépendant glycosyltransférase (figure 22). Comme déjà signalé précédemment, les derniers stades de développement de la fraise sont accompagnés d'un changement dans la pigmentation du réceptacle. Au début du développement, la chlorophylle donne la teinte verte au fruit. Sous l'effet des chlorophyllases, celle-ci est dégradée et d'autres pigments, les anthocyanes, s'accumulent à ce moment dans le fruit. Le principal type d'anthocyane donnant sa couleur rouge à la fraise est le pelargonidole (pelargonidin-glucoside). Cette accumulation de pigments est utilisée comme marqueur pour suivre la maturation.

3.3.3. L'arôme de la fraise et l'accumulation de sucres

La qualité des fraises dépend fortement du stade auquel le fruit est prélevé. La fraise doit être cueillie « mûre », afin qu'elle accumule suffisamment de sucre et de composés aromatiques. De même que la coloration, la production de composés volatils aromatiques et l'accumulation de sucres sont des caractéristiques des fruits. Les fraises ont un goût doux et une faible touche d'acidité. L'arôme de la fraise est un mélange complexe d'environ 200 composés différents. Certains composés ont une origine lipidique. Ainsi, l'ACP (« acyl carrier protein ») mise en évidence par Manning jouerait un rôle dans la biosynthèse des composés volatils.

Le sucrose constitue la principale forme de sucre présent chez la fraise. L'accumulation de sucre peut être très importante dans le fruit. Un transporteur putatif de sucrose fait partie des 26 familles décrites par Manning. Ce transporteur aurait pour fonction l'incorporation du sucre au niveau des cellules du fruit.

Enfin, et ce qui nous intéresse principalement ici, Manning a mis en évidence parmi les ADNc exprimés pour la maturation, une cellulase.

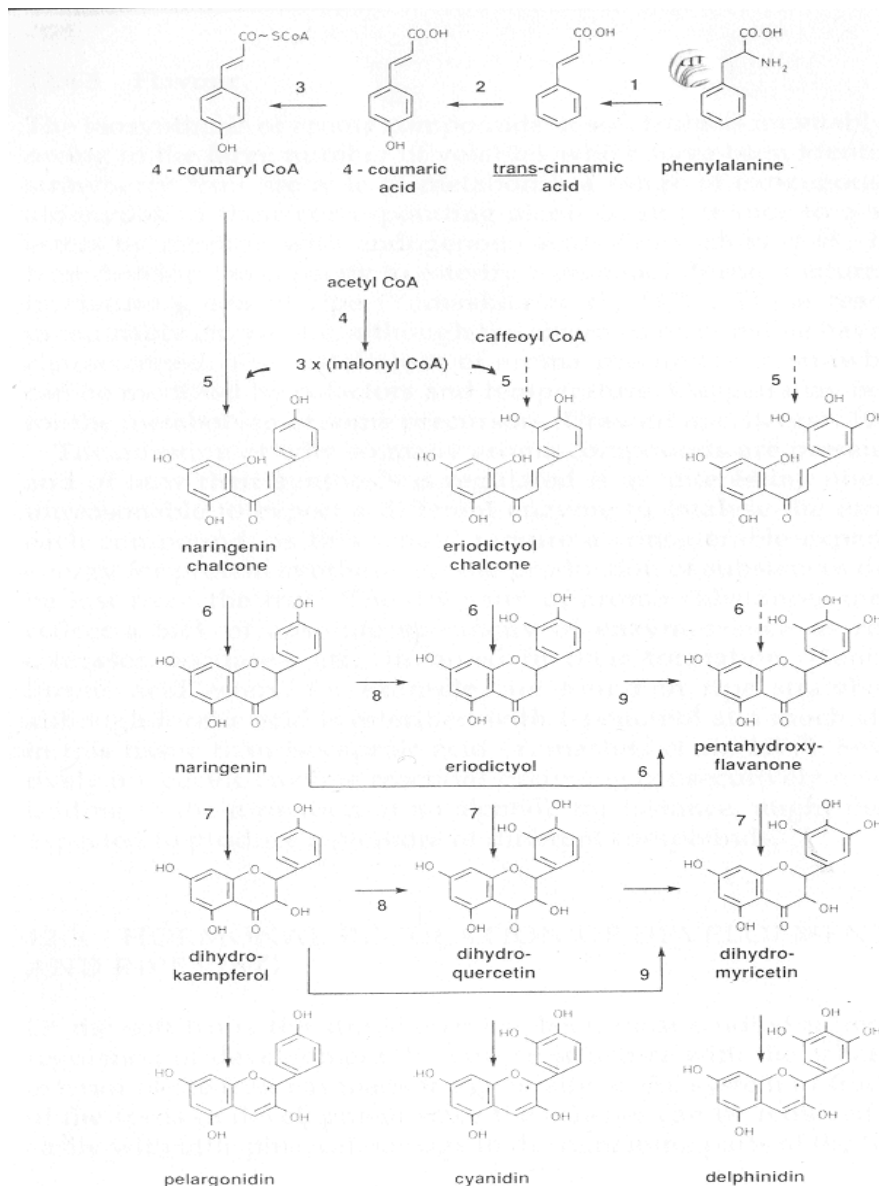


Figure 22. Voie de synthèse des anthocyanes. Les principales enzymes impliquées dans la synthèse d'anthocyanes: la chalcone synthase, la chalcone reductase, la flavonoïde-3-hydroxylase, la O-méthyltransférase et 2 UDP dépendant glycosyltransférase.

3.3.4. Les enzymes impliquées dans la maturation de la fraise

3.3.4.1. Les cellulases

En 1998, Harpster et ses collaborateurs ont mis en évidence un ADNc codant pour une cellulase spécifique de la maturation et inhibée par l'auxine. Cette cellulase, Cell1, est détectée en premier lieu en fin de stade fruit blanc et est présente tout au long des derniers stades de la maturation. L'analyse Northern blot a montré la présence de cette cellulase seulement au niveau des fruits. Elle est absente de tous les autres organes de la plante, tels que les feuilles, racines et stolons. Les fruits dé-achénés présentent une coloration accélérée

ainsi qu'une expression importante de cette cellulase. De même des fruits non dé-achénés mais traités à l'auxine, montrent des expressions réduites de la cellulase Cell1.

En 1999, Llop-Tous et ses collègues ainsi que Trainoti et ses collaborateurs ont mis en évidence une seconde cellulase, Cel2 (FaEG3), de structures secondaires et tertiaires différentes de Cell1. Cette cellulase présente un domaine putatif de liaison à la cellulose en position carboxy-terminale. Contrairement à la cellulase Cell1, son expression débute dès le stade vert et reste constante à partir du stade blanc. Son expression précoce pourrait suggérer qu'elle participerait à des phénomènes d'expansion cellulaire lors des premiers stades de développement du fruit. Elle pourrait également être impliquée dans les premières modifications du réseau hémicellulosique menant au ramollissement du fruit. Cette isoforme est également exprimée dans d'autres organes en croissance tels les stolons, les jeunes feuilles ou encore les jeunes plantules.

Cell1 a été caractérisée par Woolley et ses collaborateurs (2001) et son rôle dans le ramollissement du fruit a été investigué par la réalisation d'un transgène anti-Cell1. Bien que la quantité d'ARNm codant pour Cell1 soit fortement réduite dans les fruits des transformants, l'activité cellulase est toujours détectable et aucune différence de fermeté entre le fruit témoin et le fruit transformé n'a été mise en évidence. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de Cel2 qui n'est pas éteinte au cours de la maturation des fruits provenant des transgènes. Ces résultats mettraient en évidence, de manière indirecte, l'importance de cette cellulase Cel2 dans le mûrissement de la fraise.

Enfin des promoteurs de ces gènes Cell1 et Cel2 ont été clonés et analysés (Spolaore *et al.*, 2003). La force de ces deux promoteurs est identique et leur régulation serait réalisée par la présence en aval du promoteur, d'une région spécifique pour chacune des isoformes.

3.3.4.2. Les expansines

Il a été démontré *in vitro* que les expansines étaient des protéines intervenant dans la modification de la paroi végétale en clivant les ponts hydrogène formés entre les molécules de xyloglucane et les microfibrilles de cellulose. Une séquence d'expansine (FaExp2) a été clonée du fruit rouge (Civello *et al.*, 1999). Cette enzyme est absente au stade vert mais son expression augmente du stade blanc au stade rouge mature. Son expression n'est pas observée dans les autres organes de la plante. Contrairement aux cellulases dont nous avons parlé précédemment, cette enzyme spécifique de la maturation n'est que peu influencée par le taux d'auxine présent dans les tissus.

L'identification et la caractérisation de 6 expansines (FaExp3 à FaExp7, ainsi que l'isoforme FaExp2 déjà obtenue par Civello), isolées à partir des fruits, ont été réalisées par Harrison et ses collaborateurs en 2001. L'isoforme FaExp3 est exprimée dans la plupart des organes du fraisier. Elle est exprimée dans le fruit lors du stade vert puis n'est plus détectée jusqu'au stade rouge où elle est faiblement exprimée. L'isoforme FaExp4 est elle aussi ubiquiste. Ses taux d'expression au cours de la maturation sont élevés depuis le stade blanc jusqu'au stade rouge mature. Les ARNm codant pour les formes FaExp6 et FaExp7 sont présents en faible teneur au niveau du fruit, mais sont principalement exprimés au niveau des stolons. Enfin, les isoformes FaExp2 et FaExp5 sont spécifiquement exprimés au cours de la maturation. Leur niveau d'expression augmente du stade « Turning » au stade rouge mature pour FaExp5, et du stade blanc au stade rouge mature pour FaExp2.

3.3.4.3. Les polygalacturonases

Le ramollissement de la fraise coïncide avec une augmentation importante de la solubilisation des acides galacturoniques de la paroi cellulaire végétale (Huber *et al.*, 2001). Parmi les enzymes impliquées dans le désassemblage de ces constituants pariétaux, on retrouve les polygalacturonases. Une faible activité PG est détectable au niveau du fruit (Nogata *et al.*, 1993). Toutefois une endopolygalacturonase spécifique du fruit a été mise évidence par Redondo-Nevado et ses collaborateurs (2001). Cette enzyme est exprimée exclusivement dans deux stades de maturation du fruit, W1 et W2, avec une forte prédominance au stade W2. Par contre aucune expression n'a été détectée au stade vert (stade de croissance du fruit) et aux stades de mûrissement avancé. Cette enzyme est sous contrôle de l'auxine produite par les achènes : les fruits verts dé-achénés montrent une expression de l'enzyme, qui peut être supprimée par le traitement de ces mêmes fruits par l'acide naphthalène acétique (NAA). Sur base de ces résultats, les auteurs émettent l'hypothèse d'un rôle physiologique important dans le processus de maturation. D'après ceux-ci, la PG n'interviendrait pas directement dans la dégradation de la paroi cellulaire conduisant au ramollissement mais jouerait plutôt un rôle dans la production de molécules-

signal biologiquement actives, les oligosaccharines (Ridley *et al.*, 2000). Les molécules-signal saccharidiques auraient un effet antagoniste sur l'action de l'auxine, comme cela a déjà été observé dans le phénomène d'abscission (Kalaitzis *et al.*, 1997).

3.3.4.4. Les pectate lyases

D'autres enzymes de désassemblage de la paroi cellulaire agissant sur les polymères pectiques ont été détectées chez la fraise. Ainsi, un gène de pectate lyase (*plC*) a été isolé de la fraise en cours de maturation (Medina-Escobar *et al.*, 1997). Cette séquence présente un taux d'expression basal du stade G1 au stade W1 et son expression est maximale depuis le stade W2 jusqu'au stade rouge mature. Cette séquence n'est pas exprimée dans les organes végétatifs de la plante. De plus, les expériences menées sur les fruits verts dé-achénés traités ou non à l'auxine, montrent que cette hormone présente un effet inhibiteur sur l'expression de ce gène.

Deux autres isoformes de pectate lyase, *plA* et *plB*, ont été caractérisées par Benítez-Burraco et ses collaborateurs (2003). L'expression de ces isoformes est similaire à celle observée pour *plC*, à savoir un début d'expression au stade W2 du fruit qui se poursuit tout au long de la maturation. De même ces isoformes ne sont pas exprimées dans d'autres organes de la plante. Par immunolocalisation, la présence de ces isoformes a été mise en évidence dans les cellules parenchymateuses du réceptacle du fruit au stade rouge et est bien absente du stade vert. De plus, *plA* et *plB* sont également réprimées toutes deux par l'auxine. Enfin, l'expression de ces isoformes est fortement réduite dans les fruits prélevés et conservés dans une atmosphère contrôlée contenant de fortes quantités en CO₂ et est corrélée avec une augmentation de 20 à 30 % de la fermeté des fruits.

Sur base des résultats de Medina-Escobar, des manipulations génétiques par antisens anti-*plC* ont été réalisées afin de démontrer le rôle des pectate lyases dans le ramollissement du fruit (Jimenez-Bermudez *et al.*, 2002). Chez les transgènes, une forte réduction du taux de transcrits de l'enzyme a pu être observé. Cette réduction va de pair avec une augmentation des pectines liées de manière ionique à la paroi ainsi qu'une fermeté plus importante des fruits. Le ramollissement de ceux-ci est réduit tout au long de la maturation mais également après cueillette du fruit.

Les résultats présentés dans ces articles suggèrent un rôle important joué par les pectate lyases dans le ramollissement de la fraise.

3.3.4.5. Les pectines méthylestérases

Au cours de la rédaction de ce manuscrit, Castillejo et ses collègues (2004) ont publié un article traitant de l'expression de PME au cours de la maturation. Quatre ADNc différents codant pour des PME ont été isolés. Une isoforme (FaPE1) est spécifiquement exprimée lors de la maturation, depuis le fruit blanc jusqu'au fruit sénescant. L'expression maximale est mesurée dans le fruit rouge et est absente dans les autres organes de la plante comme les feuilles, les stolons et les racines. L'isoforme FaPE2 est elle exclusivement exprimée au niveau des feuilles. Les isoformes FaPE3 et FaPE4 sont ubiquistes. FaPE3 montre des taux d'expression élevés dans chacun des organes, y compris dans les différents stades de maturation du fruit. Quant à FaPE4, son expression maximale est détectée dans les petits fruits verts et les stolons, mais est toutefois exprimée au cours de la maturation. Le promoteur de l'isoforme FaPE1 possède 3 sites de régulation par l'éthylène (Ethylene responsive element, ERE). Le traitement de fruits avec de l'éthylène montre une diminution de l'expression de FaPE1. De même le traitement réalisé avec le 1-MCP (inhibiteur de la perception de l'éthylène), montre une activation de l'expression de cette isoforme. L'inhibition de FaPE1 lors de la sénescence du fruit par l'éthylène endogène augmenterait le degré moyen de méthylestérification des pectines et réduirait alors la stabilisation par les ions calcium via les conformations egg-box. Cette incapacité à fixer le calcium conduirait à une séparation cellulaire et aurait un effet négatif sur l'intégrité du fruit.

L'ensemble de ces résultats montre la complexité des mécanismes impliqués dans la maturation des fruits ainsi que la complexité de l'étude de ceux-ci. Bien qu'il semble que les pectate lyases soient les acteurs déterminants dans le ramollissement du fruit, l'activité des autres classes enzymatiques n'est pas à exclure. L'activité associée de plusieurs de ces enzymes est sans doute nécessaire pour le ramollissement du fruit et peut-être plus particulièrement les PME dont l'action préalable est indispensable pour permettre l'activité pectate lyase.

Chapitre II. Matériel et méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

1. Test immunochimique : ELISA inhibiteur

Le test a été réalisé sur les principaux stades de développement de la fraise. Les tissus sont broyés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

Solutions et matériel

- Plaque de microtitration en polystyrène : Nunc-immuno module Maxisap F-8 (n° Cat468667)
- PLL (poly L-lysine hydrobromide, PM 210500 ; Sigma ; P-1399)
- Poudre de lait (Gloria)
- Tampon T/Ca/Na : Tris-HCl 20 mM pH 8.2, CaCl₂ 0.5 mM, NaCl 150 mM
- Pectine : acide polygalacturonique (PGA) ; Sigma ; P-3889 Lot 68FO8231 (solution stock 1 mg/ml en H₂O, pH 7 avec NaOH ; conservées -20°C)
- SAM : sheep anti-mouse horse radish peroxydase linked ; Amersham ; NA931
- Enhanced K-blue TMB substrat : Neogen Corporation, Lexington KY WA (n°308177)

Protocole

- Traiter la plaque multipuits pendant 1h à température ambiante avec 2.5 µg/puit d'une solution PLL
- Laver 1 fois avec tampon T/Ca/Na afin d'éliminer l'excès de PLL
- Ajouter 10 µg/puits de PGA à 200 µg/ml en tampon T/Ca/Na. Incuber 1 nuit à 4°C
- Laver les puits avec 250 µl de tampon T/Ca/Na puis ajouter 25 µl/puit de tampon T/Ca/Na et poudre de lait 2 %. Incuber 2h à 37°C
- Préparer les polysaccharides inhibiteurs
 - Test natif
 - Peser 25 mg de broyat de tissus de fruit
 - Solubiliser le broyat dans 1.25 ml d'eau désionisée. Incuber 30 minutes à 4°C sous agitation
 - Ajouter à l'échantillon 11.25 ml de tampon T/Ca/Na et poudre de lait 1 %
 - Ajouter 12 ml de solution d'anticorps 2F4 dilué 250 x dans le de tampon T/Ca/Na et poudre de lait 1 %. Incuber 30 minutes à température ambiante sous agitation
 - Centrifuger l'échantillon 10 minutes à 7500 g à 4°C
 - Test déestérifier chimiquement
 - Peser 25 mg de broyat de tissus de fruit
 - Solubiliser le broyat dans 1.25 ml de NaOH 0.05 M. Incuber 30 minutes à 4°C sous agitation
 - Neutraliser l'échantillon avec 11.25 ml de tampon T/Ca/Na et poudre de lait 1 %
 - Ajouter 12 ml de solution d'anticorps 2F4 dilué 250 x dans le de tampon T/Ca/Na et poudre de lait 1 %. Incuber 30 minutes à température ambiante sous agitation
 - Centrifuger l'échantillon 10 minutes à 7500 g à 4°C
- Préparation des solutions contrôle PGA
 - Préparer des solution de PGA de concentrations croissantes (0.004, 0.04, 0.4, 4, et 40 µg/ml) dans le de tampon T/Ca/Na et poudre de lait 1 %
 - Ajouter 1 volume de solution d'anticorps 2F4 dilué 250 x dans le tampon T/Ca/Na et poudre de lait 1 %. Incuber 30 minutes à température ambiante sous agitation
 - Centrifuger l'échantillon 10 minutes à 7500 g à 4°C
- Après les 2 heures de saturation de la plaque, laver les puits avec 250 µl de tampon T/Ca/Na et poudre de lait 1 %
- Déposer dans les puits 50 µl des solutions d'inhibition natives et déestérifiées ainsi que des solutions contrôles PGA. Incuber 1 heures à 37°C
- Laver les puits 8 x avec le tampon T/Ca/Na additionné de Tween-20 à 0,1%
- Ajouter par puits 50 µl d'anticorps secondaire SAM dilué 5000 x en T/Ca/Na et poudre de lait 1 %. Incuber 1 heure à 37°C
- Laver les puits 8 x avec le tampon T/Ca/Na additionné de Tween-20 à 0,1%
- Révéler en ajoutant 100 µl de substrat K-blue par puits. Incuber 20 minutes à l'obscurité. Stopper la réaction en ajoutant 50 µl d'HCl 1N
- Effectuer la lecture à 450 nm à l'aide du lecteur Titrek multiscan (programme Monocar)

2. Méthode relative à l'analyse des protéines

2.1. Extraction des protéines pariétales du fruit

Solutions

- Tampon d'extraction A : K_2HPO_4 76 mM ; KH_2PO_4 27 mM ; EDTA 25 mM ; Cystéine 1 mM ; PVPP 50 g/l ; PMSF 1 mM ; pH 7.3
- Tampon d'extraction B : K_2HPO_4 76 mM ; KH_2PO_4 27 mM ; EDTA 25 mM ; Cystéine 1 mM ; PVPP 50 g/l ; PMSF 1 mM ; Triton X-100 2 % (V/V) ; NaCl 2 M ; pH 7.3

Protocole

Toutes les opérations sont réalisées à 4°C

- Broyer les tissus dans l'azote liquide
- Laisser décongeler le broyat dans 3 volumes de tampon d'extraction A. Vortexer pour remettre en suspension
- Extraire les protéines pendant 30 minutes sous agitation
- Centrifuger l'extrait 30 minutes à 4000 g (centrifugeuse Beckman-Coulter, Allegra X22R). Eliminer le surnageant
- Laver le culot deux fois avec le tampon d'extraction A. Pour cela, resuspendre le culot dans 3 volumes de tampon d'extraction A, placer sous agitation pendant 10 minutes et centrifuger à 4000 g (centrifugeuse Beckman-Coulter, Allegra X22R) pendant 15 minutes puis éliminer le surnageant
- Resuspendre le culot dans 3 volumes de tampon d'extraction B
- Extraire les protéines 60 minutes sous agitation
- Centrifuger 30 minutes à 4000 g (centrifugeuse Beckman-Coulter, Allegra X22R)
- Récupérer le surnageant et filtrer sur membrane Miracloth (Calbiochem)
- Récupérer la fraction filtrée (protéine pariétale)
- Dialyser 1 nuit contre de l'eau désionisée
- Concentrer l'extrait protéique avec une colonne de type Amicon Ultra (Millipore, cut-off de 5 kDa, 15 ml). Centrifuger les colonnes à 4000 g jusqu'à l'obtention d'un volume d'extrait de 250 μl
- Récupérer l'extrait et congeler à -80°C

2.2. Dosage des protéines (Kit NanoOrange, Molecular Probes)

Les protéines pariétales extraites depuis les fruits ont été dosées avec le kit NanoOrange Protein Quantification (N-6666)

Solutions

- NanoOrange protein quantification reagent (Composé A)
- NanoOrange protein quantification diluent (Composé B)
- Bovine serum albumin (BSA) standard (Composés C)

Protocole

- Diluer 10 fois la solution B dans de l'eau désionisée.
- Diluer 500 fois la solution A dans la solution B diluée
- Préparer les solutions de BSA de concentrations différentes pour réaliser la courbe de calibration : 10 $\mu\text{g/ml}$ de solution A diluée, 6 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0.6 $\mu\text{g/ml}$, 0.3 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, et 0 $\mu\text{g/ml}$
- Préparer les échantillons en les diluants 60 fois dans la solution A diluée
- Incuber les échantillons protéiques et les solutions de BSA pendant 10 minutes entre 90 et 96°C, à l'abri de la lumière
- Laisser refroidir pendant 20 minutes à température ambiante
- Mesurer la fluorescence. Pour ce faire, transférer 2 ml d'échantillon dans une cuvette de spectrophotomètre. L'excitation est réalisée à 485 nm et l'émission à 590 nm

2.3. Vérification de l'activité PME en « Cup-Plate »

Pour la détection des isoformes de PME en IEF, les enzymes extraites doivent conserver leur activité enzymatique. Cette technique est utilisée afin de mettre en évidence l'activité PME dans les extraits pariétaux.

Solutions

- Solution de pectine de Citrus et d'agarose : Tris/HCl 20 mM ; EDTA 5 mM ; NaCl 160 mM ; pH 7.6 ; Pectine de Citrus (degré de méthylation 94%) 1% (Sigma P-9561) ; Agarose 1%
- Rouge de Ruthénium 0.05%

Protocole

- Prépare le d'agarose 1 % et de pectines de citrus dans une boîte de Pétri
- Au moyen d'un emporte-pièce, creuser des puits dans le gel refroidi
- Remplir les puits avec l'échantillon à tester
- Incuber pendant un minimum de 24 heures à 25°C
- Révéler l'activité PME en présence d'une solution de rouge de Ruthénium 0.05%. Laisser pénétrer le colorant
- Rincer le gel d'agarose avec de l'eau désionisée

L'activité est révélée par la présence de halos rouges sur fond rosé

2.4. Analyse de l'activité PME par test colorimétrique

Ce test consiste à observer l'acidification d'une solution sous l'action des PME au niveau des pectines. Cette acidification est suivie par l'intermédiaire de la variation de la couleur d'une solution contenant un indicateur de pH.

Le rouge de méthyl est un indicateur de pH qui vire entre 6 et 7. Il est de couleur jaune à pH basique et vire au rouge, en passant par l'orange, à pH acide.

Solutions

- Solution de pectine de Citrus : Tris/HCl 20 mM ; EDTA 5 mM ; NaCl 160 mM ; pH 7.6 ; Pectine de Citrus (degré de méthylation 94%) 1%
- Rouge de méthyle 0.2%

Protocole

- Ajouter 20µl d'échantillon protéique à 100µl de solution de pectine de Citrus 1% et rouge de méthyl 0.002%
- Incuber la solution à 25°C

2.5. Isoélectrofocalisation (IEF)

Cette technique permet de séparer les différentes isoformes d'une enzyme suivant leur point isoélectrique. La détection des isoformes de PME est réalisée par la révélation de l'activité de ces enzymes.

Solutions et matériel

- NaOH 1 M
- H₃PO₄ 1 M
- Tampon d'équilibrage : Tris/HCl 20 mM ; EDTA 5 mM ; pH 8.5
- Solution de pectine de Citrus : Tris/HCl 20 mM ; EDTA 5 mM ; NaCl 160 mM ; pH 7.6 ; Pectine de Citrus (degré de méthylation 94%) 1%
- Rouge de Ruthénium 0.05%
- Système MultiTempII

Protocole

- Refroidir le système MultiTemp II (2117, Pharmacia) à 11 °C pendant 1 heure avant de réaliser l'IEF
- Démouler le gel (Ampholine PAGplate, Pharmacia) et le placer sur la plaque de céramique du système MultiTemp II, préalablement humidifiée en évitant la formation de bulles entre le gel et la plaque
- Plonger les plaques d'électrodes dans la solution adéquate (NaOH ou H₃PO₄) et disposer ceux-ci aux extrémités supérieure et inférieure du gel
- Effectuer un Pre-run de 20 minutes
- Déposer 20 µl d'échantillon sur 1 cm² de papier d'électrode positionné en surface du gel
- Effectuer la migration pendant 2 heures

Condition de migration (E700 power supplies, Consort)

Pre-run	Run1	Run2
40 V/cm	40 V/cm	80 V/cm
0.6 mA/cm	0.6 mA/cm	0.6 mA/cm
0.6 W	0.6 W/cm	0.6 W/cm
20 minutes	1 heure	1 heure

Révélation de l'activité PME

- Après migration, équilibrer le gel pendant 30 minutes dans le tampon d'équilibration.
- Placer le gel dans la solution de pectines de Citrus pendant 1h30
- Rincer le gel dans de l'eau désionisée
- Immerger le gel dans la solution de rouge de Ruthénium pendant 30 minutes
- Décolorer le gel avec de l'eau désionisée

3. Méthode relative à l'ARN

4.1. Extraction d'ARN total (Kit Quiagen)

L'extraction d'ARN total depuis les fruits a été réalisée avec le kit RNeasy Plant Minikit de chez Quiagen (74903).

Le protocole détaillé de ce kit est disponible à l'adresse suivante :
http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/RNAstabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_Mini/1016272HBRNY062001WW.pdf

4.2. Synthèse de cDNA (Kit Amersham/Pharmacia)

La synthèse du premier brin d'ADNc a été réalisée avec le kit First-Strand cDNA Synthesis Kit (27-9261-01).

Protocole

- Mettre 4 µg d'ARN total dans un eppendorf "RNase free"
- Ajuster le volume à 8 µl avec de l'eau DEPC
- Chauffer à 65°C pendant 10 min
- Mettre rapidement sur glace
- Homogénéiser le mix (FPLCpure™ murine reverse transcriptase, RNA guard™ (porcine), Rnase/Dnase-free BSA, dATP, dCTP, dGTP, et dTTP)
- Ajouter 5 µl de ce mix
- Ajouter 1 µl de DTT (200mM)
- Ajouter 1 µl de primer NotI(dT)₁₈ (non dilué ou dilué)
- Incuber 1 h à 37°C

4. Méthode relative à l'ADN

4.1. Extraction d'ADN génomique (Kit Sigma)

L'ADN génomique de fruit et de plantule a été extrait à l'aide du kit GenElute Plant Genomic DNA Miniprep de chez Sigma (G2N-10). Le protocole suivi est disponible à l'adresse suivante : <https://www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/g2n10bul.pdf>

4.2. Réaction de PCR

Appareils PCR : Minicycler TM (MJ Research, Biozym) ; GeneAmp PCR system 2400 (PERKIN ELMER) ; PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Biozym).

4.2.1. Réaction d'amplification à partir d'ADN en solution

x µl d'ADN (x est fonction de la concentration en ADN)
 5 µl de tampon PCR 10X (Roche, n°1435094)
 1 µl de dNTP Mix (10 Mm) (Roche, n°1814362)
 10 pmoles d'amorce gauche
 10 pmoles d'amorce droite
 1 unité de Taq polymérase (Roche, n°1435094)
 y µl d'H₂O pour atteindre 50 µl

4.2.2. Réaction d'amplification sur colonies bactériennes

Colonie bactérienne prélevée à l'aide d'un embout stérile
 5 µl de tampon PCR 10X (Roche, n°1435094)
 1 µl de dNTP Mix (10 Mm) (Roche, n°1814362)
 10 pmoles d'amorce gauche
 10 pmoles d'amorce droite
 1 unité de Taq polymérase (Roche, n°1435094)
 y µl d'H₂O pour atteindre 50 µl

4.2.3. Cycles d'amplification typiques

Les amplifications ont été réalisées sur l'appareil Minicycler TM de MJ Research, Biozym.

Etape	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation	1 min	94°C	1
Dénaturation	1 min	94°C	30
Hybridation	1 min	55°C *	
Elongation	3 min	72°C	
Elongation finale	10 min	72°C	1

* cette température dépend des amorces utilisées

4.3. Electrophorèse d'ADN (gel horizontal)

Les fragments d'ADN de tailles différentes ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le pourcentage d'agarose varie en fonction de la taille des fragments à séparer (plus le pourcentage est élevé, plus le gel sera dense, donc on séparera mieux les fragments de petite taille). La visualisation de l'ADN au niveau du gel est réalisée par l'utilisation du bromure d'éthidium (0,6 µg/ml de gel) qui s'intercale dans la double hélice d'ADN et qui est détecté sous U.V. L'estimation de la taille ainsi que la concentration des bandes visualisées est réalisée grâce à l'étalon de taille moléculaire SmartLadder (Eurogentec).

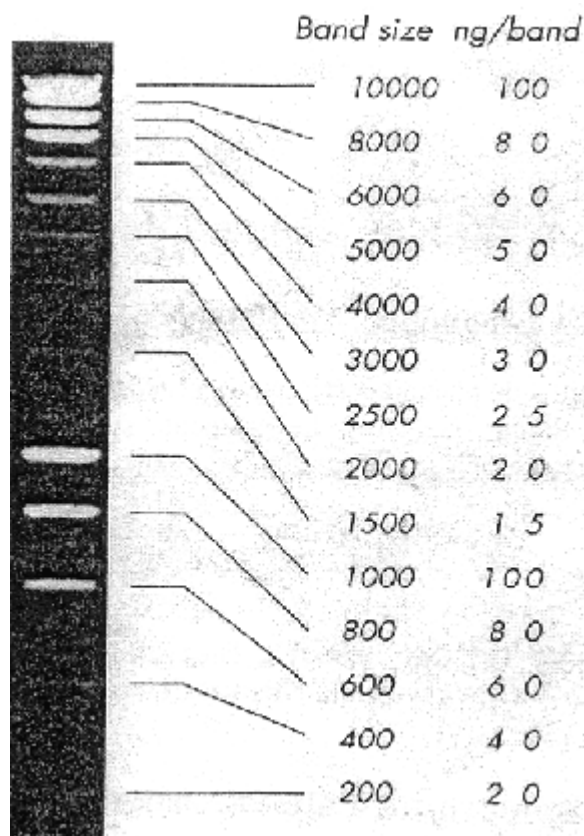


Figure 24. Smart Ladder (Eurogentec)

Matériel et solutions

- Cuve d'électrophorèse Pharmacia biotech GNA 100
- Agarose x % (Gibco BRL)
- Tampon TAE : Tris-acétate 4 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0
- Bromure d'éthidium : solution stock à 10 mg/ml
- Solution de chargement : Bleu de bromophénol 0.025%, glucose 40%
- Marqueur de taille moléculaire Smart Ladder (Eurogentec) (figure 23)

Protocole

- Préparer un gel d'agarose x% dans le tampon TAE. Ajouter 3 µl de bromure d'éthidium par 50 ml de gel
- Couler le gel dans le support adéquat, puis placer les peignes
- Placer le gel solidifié dans la cuve d'électrophorèse
- Ajouter 1 volume de bleu de chargement à 5 volumes d'échantillon
- Déposer dans les puits formés par les peignes l'échantillon à faire migrer
- Faire migrer les échantillons pendant environ 1 heure à 150v, 85-90 mA dans le tampon TAE
- Visualiser les bandes sur banc U.V. (302 nm)

4.4. Clonage des inserts**4.4.1. Culture d'*Escherichia coli***

- Milieu liquide : milieu LB (Broth Base), 20 g/l
- Milieu solide (LBA) : milieu LB, 20 g/l + agar 1,5%

La sélection de bactéries recombinantes est réalisée sur milieu LB contenant de l'ampicilline (Sigma A0166). Celle-ci est utilisée à une concentration de 200 µg/ml. Les antibiotiques sont rajoutés, à partir d'une solution stock à 20 mg/ml, dans le milieu ou sur la boîte de Pétri en fonction des besoins.

Les clones bactériens ont été conservés à -70°C dans du milieu LB liquide contenant 15% de glycérol (aliquote de 1 ml). Les clones couramment utilisés ont été conservés à 4°C sur milieu LB solide.

4.4.2. Préparation de l'ADN plasmidique d'*Escherichia coli* (Kit Roche)

La purification des plasmides d'*Escherichia coli* a été réalisée avec le kit Miniprep High pure plasmid isolation (Roche, 1 754 785)

Protocole

- Ensemencer 10 ml de milieu LB, auxquels est ajouté l'antibiotique adéquat, avec une colonie bactérienne. Incuber la culture pendant une nuit à 37°C sous agitation
- Centrifuger à vitesse maximum 4 ml de la solution de bactérie. Eliminer le surnageant
- Placer le « Binding Buffer » sur glace
- Ajouter 250 µl de « Suspension Buffer avec Rnase » directement sur le culot bactérien. Resuspendre le culot en mélangeant par pipetage
- Ajouter 250 µl de tampon de lyse. Mélanger 3 à 6 fois par inversion (3 à 6X). **Précaution :** ne pas vortexer la solution afin d'éviter la dissociation de l'ADN plasmidique
- Incuber maximum 5 min à température ambiante
- Ajouter 350 µl « Binding Buffer ». Mélanger 3 à 6 fois par inversion
- Incuber sur glace pendant 5 minutes
- Centrifuger l'échantillon 10 minutes à vitesse maximale à température ambiante
- Transférer l'entièreté du surnageant dans le réservoir de la colonne High Pure avec filtre
- Centrifuger 1 minute à vitesse maximale à température ambiante
- Eliminer le liquide filtré. Laver la colonne avec 500 µl de « Washing Buffer 1 »
- Centrifuger 1 minute à vitesse maximale à température ambiante
- Laver la colonne avec 700 µl de « Washing Buffer 2 »
- Centrifuger 1 minute à vitesse maximale à température ambiante
- Ajouter 10 µl de tampon d'élution sur le filtre de la colonne
- Centrifuger 1 minute à vitesse maximale à température ambiante pour récolter l'ADN plasmidique purifié

4.4.3. Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose (Kit Qiagen)

Protocole

- Couper la bande de gel contenant l'ADN à purifier à l'aide d'un scalpel tranchant et stérile
- Peser le morceau de gel découpé. Ajouter 3 volumes de tampon QX1 à 1 volume de gel
- Resuspendre la résine QIAEX II au vortex pendant 30 secondes.
- Ajouter 30 µl de QIAEX II à l'échantillon et mélanger (la quantité de QIAEX II ajoutée dépend du nombre de µg d'ADN dans l'échantillon)
- Incuber l'échantillon à 50°C pendant 10 minutes. Maintenir la résine QIAEX II en suspension en vortexant toutes les 2 minutes. Cette étape permet la solubilisation de l'agarose et la fixation de l'ADN à la résine
- Centrifuger la solution à 13.000 rpm (centrifugeuse Biofuge A 1378) pendant 30 secondes
- Retirer avec précaution le surnageant à l'aide d'une pipette
- Ajouter 500 µl de tampon QX1. Resuspendre le culot en vortexant, puis centrifuger à 13.000 rpm (centrifugeuse Biofuge A 1378) pendant 30 secondes. Eliminer le surnageant avec une pipette
- Ajouter 500 µl de tampon PE. Resuspendre le culot en vortexant puis centrifuger à 13.000 rpm (centrifugeuse Biofuge A 1378) pendant 30 secondes. Eliminer le surnageant avec une pipette. Réaliser cette étape une deuxième fois
- Laisser sécher le culot 30 minutes à l'air
- Ajouter 20 µl de H₂O (pH 8,0) et resuspendre le culot en vortexant. Incuber 5 minutes à température ambiante (cette étape permet l'élution de l'ADN de la résine QIAEX II). Centrifuger à 13.000 rpm

(centrifugeuse Biofuge A 1378) pendant 30 secondes. Réaliser ce dernier point une seconde fois pour augmenter le rendement de purification

Rem.: Le poids de la bande excisée ne doit pas dépasser 250 mg. La composition des tampons QX1 et PE n'est pas donnée dans le kit.

4.4.4. Purification par le système Microcon (Millipore)

Le système Microcon-100 permet de purifier des échantillons PCR de la polymérase, du tampon, des amorces et des nucléotides non incorporés.

- Monter la colonne sur le tube récolteur
- Ajouter 400 µl d'H₂O + 40 µl de produit PCR dans la colonne
- Centrifuger à 7.000 rpm (centrifugeuse Biofuge A 1378) pendant 15 min
- Ajouter 20 µl d'H₂O désionisée sur la colonne et retourner celle-ci sur un nouveau tube récolteur
- Centrifuger à 4.000 rpm (centrifugeuse Biofuge A 1378) pendant 15 min
- Récolter l'extrait purifié et le stocker à -20°C

4.4.5. Réaction de ligation

Matériel

- Kit de clonage pCRII (Invitrogen)
- Appareil PCR (Biozym Mini-cycler)

Protocole

- Centrifuger un tube de pCR®II pour collecter tout le liquide dans le fond du tube
- Utiliser la formule ci dessous pour estimer la quantité de produit PCR nécessaire à la ligation avec 50 ng de pCRII

$$x \text{ ng produit PCR} = \frac{(y \text{ pb produit PCR}) (50 \text{ ng pCRII vecteur})}{(\text{Taille en pb du vecteur pCRII } \sim 3900)}$$

- Réaliser le mélange suivant qui sera incubé pendant 18 heures à 14 °C dans un cycler

x µl de produit PCR (x est fonction de la concentration en ADN)	
1 µl de tampon ligation (10X)	
50 ng de vecteur pCRII	
x µl d'H ₂ O	
<u>T4 DNA ligase (4.0 unité de poids) 1 µl</u>	
Volume total	10 µl

4.4.5. Transformation des bactéries TOP10 (kit One Shot, Invitrogen)

Solutions

- Milieu SOC
 - bactotryptone 2%
 - extraits de levure 0,5%
 - NaCl 10 mM
 - KCl 2.5 mM
 - MgCl₂ 10 mM
 - MgSO₄ 10 mM
 - glucose 20 mM
- Stériliser par autoclavage (20 minutes à 121°C sous 1 atm)

Protocole

- Décongeler les cellules compétentes (50 µl) dans la glace
- Ajouter x µl du mélange de ligation. Mélanger au moyen d'une pipette
- Incuber les cellules 30 minutes dans la glace
- Incuber les cellules pendant 30 secondes dans un bain thermostaté à 42°C
- Retirer les cellules du bain le plus rapidement possible et incuber celles-ci dans la glace pendant 2 minutes
- Ajouter 450 µl de milieu SOC (maintenu à 37°C) et incuber les cellules pendant 1 heure à 37°C
- Etaler 100 µl de cellules sur le milieu sélectif adéquat et incuber à 37°C pendant 1 nuit

La sélection des bactéries est réalisée avec un antibiotique approprié et par le test lac Z (ou test blanc-bleu).

4.5. 3' et 5' RACE PCR, Kit Marathon (bd-biosciences)

Le kit Marathon (PT 1115-2) a été utilisé pour la recherche des séquences totales de pectine méthylestérases. Premièrement, une synthèse d'un premier brin d'ADNc est réalisée à partir d'ARN total extrait depuis le fruit. Ensuite, le second brin est synthétisé et des adaptateurs de séquences connues sont ligués aux extrémités des l'ADNc double brin. Une première amplification est réalisée avec des amorces spécifiques de la séquence partielle et de l'adaptateur. Une seconde PCR « Nested » est réalisée avec des amorces internes à la séquence amplifiée et à l'adaptateur (figure 24).

Le protocole détaillé de ce kit est disponible à l'adresse suivante :
<http://www.bdbiosciences.com/clontech/techinfo/manuals/PDF/PT1115-2.pdf>

5. Méthode relative à la transformation des fraisiers par *Agrobacterium tumefaciens*

5.1. Milieux de culture pour fraisiers *in vitro*

Milieu de culture ZD102 pour Fraisier *Calypso*

Milieu MS	4.405gr/l
Sucrose	3%
2.4 D	0.2mg/l
TDZ	1mg/l
Agar Plant	0.8%
pH	5.7

—► Autoclaver le milieu pour le stériliser, puis rajouter le TDZ préalablement stérilisé par filtration (Millipore 0.22µm).

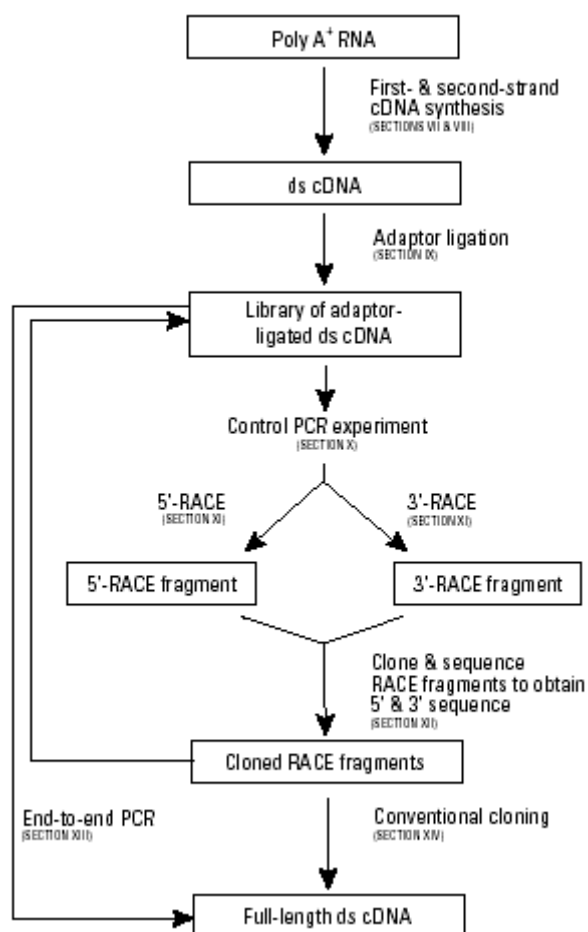


Figure 25. Représentation schématique de la réaction RACE (kit Marathon Clontech)

Milieu de multiplication pour Fraisier *Calypso*

Milieu MS	4.405gr/l
Glucose	4%
IBA	1mg/l
BAP	0.5mg/l
GA ₃	0.5mg/l
Agar	0.9%
pH	5.7

Les hormones sont stérilisées par filtration Millipore 0.22µm et le milieu par autoclave.

Milieu sans hormone B5 pour Fraisier *Calypso*

Milieu B5	3.052gr/l
Sucrose	3%
Vitamine	Dilution 1X
Myo-inositol	0.5gr/l
Caséine	0.5gr/l
Agar	0.6%
pH	5.7

Solution de vitamines (10000X concentrée)

Thiamine HCl	10mg/l
Lyridine HCL	10mg/l
Nicotiniq Acid	50mg/l

5.2. Protocole de transformation de fraisiers *Calypso* par *Agrobacterium tumefaciens*

3 types de milieux seront préparés d'avance :

- Milieu ZD102 (pour les précultures)
- Milieu ZD102 + céfotaxine (Duchefa Bioch. CO111002J) + timentine (Duchefa Bioch. T0190) (pour l'élimination d'*Agrobacterium*)
- Milieu ZD102 + céfotaxine + timentine + kanamycine (pour la sélection des cellules végétales transformées)

Mise en culture d'*Agrobacterium tumefaciens* :

→ Milieu LB + Antibiotique

Kanamycine (Sigma K400)	50mg/l
Rifampicine (Sigma R8883)	10mg/l
Streptomycine (Sigma S5601)	25mg/l
Gentamycine (Sigma G1264)	50mg/l

Mettre en culture la bactérie contenant la construction ARNi, à 30°C en rotation.

Sous hotte à flux laminaire, prélever quelques feuilles de fraisier *Calypso* en culture in vitro, puis les disposer sur le milieu ZD102, sur boîte de Pétri.

Laisser en chambre de culture jusqu'à la transformation (2 jours).

1. Exciser, sous hotte à flux ascendant, des feuilles de la préculture, en prenant aussi la nervure centrale.
2. Plonger ensuite les feuilles dans 25 ml de culture d'*Agrobacterium* (DO 0.6 - 0.8).
3. Incuber environ 20 minutes, mélanger de temps en temps.
4. Rincer les feuilles dans une solution d'H₂O stérile.
5. Appliquer par après les feuilles entre 2 buvards, afin d'éliminer l'excès de bactérie.
6. Renouveler le milieu après 2-3 jours, cette fois-ci avec antibiotiques (céfotaxine 100 mg et timentine) pour éliminer *Agrobacterium*.
7. Pour la sélection des cellules végétale transformées, utiliser du milieu ZD102 contenant toujours la céfotaxine et la timentine, avec en plus de la kanamycine.

Chapitre III. Résultats et discussions

Chapitre III. Résultats et discussions

1. Rappel de la maturation et du ramollissement

1.1. Compréhension actuelle de la maturation de la fraise

La maturation du fruit chez la fraise, est un processus de développement génétiquement programmé depuis les premiers stades, jusqu'à la sénescence. Les caractéristiques et la composition du fruit mûr résultent de changements biochimiques et physiologiques. L'auxine, produite au début du développement par les achènes, active l'expansion du réceptacle. La chlorophylle donnant la couleur verte au fruit de départ, est progressivement dégradée pour faire place à d'autres pigments, comme les anthocyanes, qui donneront au fruit mûr, sa teinte rouge. Parallèlement, une accumulation de composés aromatiques et de sucres est observée. Lorsque les achènes arrivent à maturité, la production d'auxine est stoppée. Certaines enzymes, jusqu'alors inhibées par cette hormone, sont activées. C'est le cas des enzymes hydrolytiques, telles que les polygalacturonases et les pectate lyases, qui vont alors s'attaquer aux liaisons glycosidiques des polysaccharides formant le réseau pectique de la paroi cellulaire végétale. Ces dégradations vont conduire à un ramollissement suivi d'une détérioration de la texture du fruit.

1.2. L'étude des enzymes impliquées dans le ramollissement

L'étude de ces enzymes par transgénèse est plus ou moins prometteuse. Mais les essais menés jusqu'à présent, n'ont pas donné de résultats convaincants. Le problème est que la plupart des enzymes impliquées dans le processus de maturation des fruits, le sont également dans d'autres processus physiologiques. C'est le cas par exemple des pectate lyases, dont le rôle dans le ramollissement du fruit n'est plus à démontrer, mais son rôle dans la maturation du grain de pollen chez les végétaux est également important (Wing *et al.*, 1989). De plus, la dégradation de la paroi végétale n'est pas le résultat de l'action d'une seule enzyme, mais d'un groupe d'enzymes, avec des actions synergiques.

Un autre point important dans l'action des enzymes hydrolytiques de la paroi, c'est la présence indispensable de résidus galacturosyls entièrement déméthylestérifiés pour former les pectates. Une pectine hautement méthylée ne pourra pas ou difficilement être dégradée par les PG ou les PL sans l'action préalable d'une autre classe d'enzyme, les pectines méthylestérases, qui vont ôter ces groupements méthyls.

1.3. Hypothèse sur la pectine et sur sa méthylation

La pectine fait partie, avec la cellulose et l'hemicellulose, des trois constituants majoritairement présents dans la paroi cellulaire végétale, surtout au niveau des cellules du parenchyme constituant le fruit. On sait, par la littérature, que le ramollissement tardif et la perte d'intégrité tissulaire sont souvent associés à un désassemblage des constituants pectiques dans les stades tardifs de la maturation. Un autre point important déjà évoqué est l'influence de la méthylation de cette pectine sur l'activité des enzymes hydrolytiques de la paroi. Entre l'arrivée de la pectine hautement méthylée dans la paroi et sa dégradation au moment du ramollissement, il y a inévitablement des modifications au niveau des résidus galacturoniques méthylestérifiés de cette pectine. L'implication des PME dans ces modifications a déjà été évoquée dans divers articles.

Notre objectif est de mieux comprendre les phénomènes menant à la fragilisation de la fraise en étudiant cette enzyme pariétale, la PME, susceptible d'être impliquée dans le processus de maturation des fruits. Nous avons donc réalisé une étude de cette enzyme et de son substrat, aux niveaux biochimiques et moléculaire.

2. Etude biochimique des PME

Les pectines méthylestérases catalysent la déméthylestérification des résidus galacturosyls méthylestérifiés des molécules pectiques, libérant des pectines acides et du méthanol. L'action préalable de ces enzymes est nécessaire pour permettre la dépolymérisation des pectines par les polygalacturonases et les pectate lyases, car lors de sa synthèse, la pectine est sécrétée sous une forme hautement méthylée dans la paroi végétale.

2.1. La déméthylestérification des pectines au cours de la maturation

Avant de nous intéresser à l'enzyme proprement dite, nous nous sommes tout d'abord penchés sur son substrat, la pectine. Pour ce faire, nous avons réalisé des tests immunochimiques ayant pour objectif la mise en évidence du taux de méthylestérification des pectines lors des principaux stades de développement de la fraise.

La sonde immunologique utilisée lors de nos tests est l'anticorps monoclonal 2F4 produit antérieurement au laboratoire (F. Liners, 1988). La propriété principale de cet anticorps est de reconnaître spécifiquement une association de molécules pectiques formant une structure de type boîte à œufs. Les conditions expérimentales pour l'utilisation de cet anticorps ont été optimisées durant la thèse de F. Liners (1994).

2.1.1. Préparation du matériel végétal

Des fruits ont été prélevés aux principaux stades de développement : stade vert (G1), stade « gros fruit vert » (G3), stade blanc (W), stade rose (T), stade rouge mature (R) et enfin stade sénescence (OR). Les fruits ont été broyés dans l'azote liquide afin d'obtenir une poudre homogène.

2.1.2. Principe du test immunochimique (figure 25)

Le test immunochimique que nous avons réalisé est de type ELISA inhibiteur (figure 23.). Les broyats sont tout d'abord mis en solution et incubés avec l'anticorps 2F4 anti-pectines acides. Les échantillons sont centrifugés et la fraction soluble de l'anticorps est conservée. Celle-ci est ensuite déposée dans un puits d'une plaque multipuits, sur les parois duquel nous avons préalablement fixé des acides homopolysaccharidiques (PGA), puis saturé avec de la poudre de lait. Après des lavages successifs, les anticorps fixés sur les PGA sont détectés grâce à un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (SAM : sheep anti-mouse horse radish peroxydase linked). L'ajout de substrat spécifique à la peroxydase et sa modification par celle-ci, permet la lecture d'absorbance par le lecteur multiplaque. Une forte absorbance (c'est-à-dire une faible inhibition), signifie que peu de pectines acides sont présentes dans le broyat testé. A l'inverse, une faible absorbance mesurée traduit une forte inhibition, et implique la présence de grandes quantités de pectines acides dans l'échantillon.

Deux types de traitements ont été réalisés pour chacun des broyats avant l'analyse en ELISA. Le premier traitement, dit **natif** a consisté en la mise en solution des broyats dans de l'eau. Ces échantillons utilisés lors du test ELISA inhibiteur permettent de comparer les quantités de pectines acides présentes dans la solution. Le second traitement, dit **déesterifié** a consisté à déesterifier chimiquement les pectines présentes dans les broyats avec du NaOH 1 M (pH 12) avant l'analyse en test ELISA. Nous avons ainsi pu comparer les quantités totales de pectines présentes dans les différents broyats. De plus, afin de convertir les valeurs d'absorbance en quantités de pectines dans les échantillons à l'état natif et déesterifié, nous avons inclus à notre test ELISA une droite de calibration.

Le test ELISA réalisé pour cette droite de calibration est identique à celui exposé ci-dessus pour le test natif, si ce n'est que ce sont des solutions de concentrations 0,002 à 20 µg/ml de PGA qui sont utilisées en place des broyats. Un échantillon « non inhibé », c'est à dire ne contenant pas de PGA en solution a également été réalisé.

Enfin, trois réplicats sont réalisés pour chacun des échantillons. La moyenne des absorbances de ces réplicats est calculée ainsi que l'écart type. De la variabilité pouvant exister entre tests ELISA, pour chaque expérience, nous avons réalisé sur une même plaque à la fois les tests natifs, déesterifiés et la courbe de calibration.

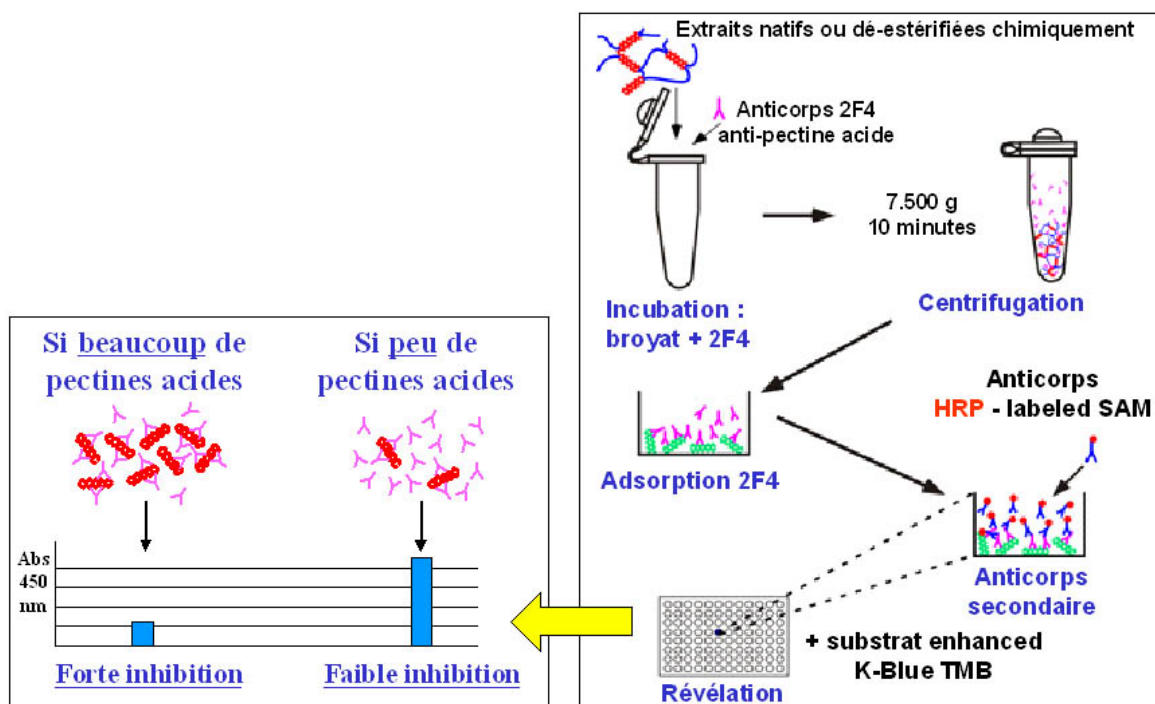


Figure 25. Principe général du test ELISA

2.1.3. Résultats de l'ELISA par inhibition

Une mise au point préalable a été nécessaire afin de déterminer la quantité optimale de matériel végétal pour la réalisation du test. En effet, la conversion des absorbances en concentrations ne peut être réalisée que si les absorbances mesurées pour les échantillons végétaux se situent entre les valeurs d'absorbance de la plus faible et de la plus haute concentration en PGA de la courbe de calibration. Différents tests ELISA ont été réalisés avec des quantités croissantes de broyats. Sur base des résultats obtenus, nous avons choisi de poursuivre nos tests avec 25 mg de broyat pour chacun des stades de développement étudiés.

2.1.3.1. La droite de calibration

La figure 26 présente la droite de calibration réalisée avec les concentrations croissantes en PGA. Une diminution de l'absorbance a été observée au fur et à mesure que la quantité de PGA augmente (de 0.002 à 20 µg/ml). Sur cette figure sont repris également l'équation et le coefficient de détermination (R^2) de la droite. Sur base de cette équation, nous avons converti les valeurs d'absorbance en quantités de pectines acides présentes dans les échantillons testés.

2.1.3.2. Analyse des échantillons à l'état natif

La figure 27 présente les valeurs d'absorbance obtenues lors du test ELISA inhibiteur réalisé avec les échantillons à l'état natif de fruits prélevés aux différents stades de développement. Les valeurs d'absorbance ont été transformées en concentrations de pectines acides dans les échantillons testés, par l'intermédiaire de la droite de calibration PGA. Les valeurs de concentration calculées sont reprises dans le tableau 1 et comparées à la figure 28.

	Concentration en pectine acide (µg/ml)
Vert (G1)	0,24
Vert G3)	0,49
Blanc (W)	0,79
Rose (T)	0,77
Rouge mature (R)	1,01
Sénescent (OR)	0,92

Tableau 1. Concentrations en pectines acides présentes dans les échantillons des différents stades de développement du fruit.

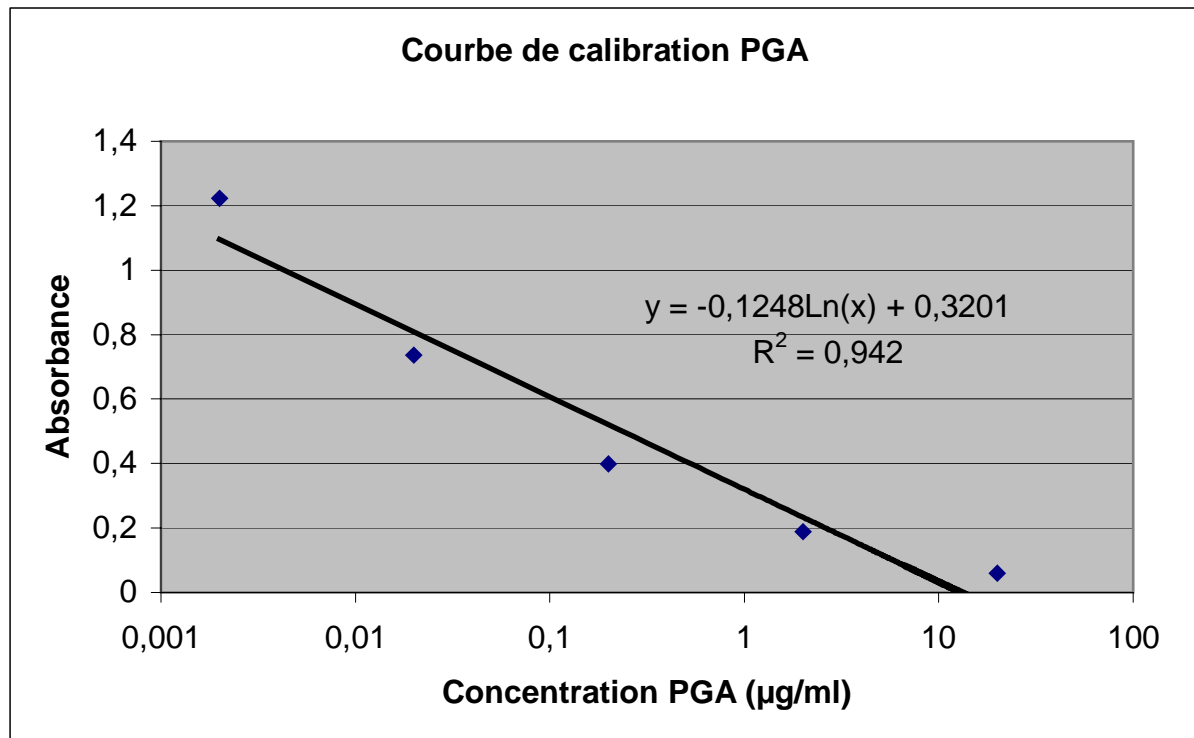


Figure 26. Courbe de calibration PGA. Des quantités croissantes en PGA (0,002 µg/ml à 20 µg/ml) ont été testées lors de l'ELISA inhibiteur avec l'anticorps 2F4.

Nous avons observé une augmentation progressive de la concentration en pectine acide au cours du développement du fruit. Cette concentration en pectine acide est de 0,24 µg/ml pour l'échantillon du stade Vert (G1) et augmente jusqu'à 1,01 µg/ml pour l'échantillon du stade rouge, soit une augmentation d'environ 4 fois. Entre le stade mature et le stade sénescence, la quantité de pectines acides n'augmente plus.

Il y a donc eu déméthylation des pectines au cours du développement. Le rôle joué par les PME dans cette augmentation en pectines acides peut être proposé sans aucun doute à ce niveau.

2.1.3.3. Analyse des échantillons déestérifiés chimiquement

La figure 27 présente les résultats d'absorbance du test ELISA inhibiteur réalisé avec les échantillons dé-estérifiés chimiquement. De même que pour les échantillons à l'état natif, les valeurs d'absorbance ont été transformées en concentrations en pectines acides (figure 29). Les concentrations en pectines acides représentent ici la quantité totale de pectines potentiellement accessibles par l'anticorps 2F4. Ces valeurs ne totalisent sans doute pas l'ensemble des pectines présentes dans les échantillons testés, mais constituent quand même une indication correcte et comparable de la teneur en pectine des différents stades de développement du fruit. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 1 et comparées sur la figure 29.

	Concentration en pectine totale (µg/ml)
Vert (G1)	4,85
Vert (G3)	6,5
Blanc (W)	3,87
Rose (T)	1,7
Rouge mature (R)	0,93
Sénescence (OR)	0,93

Tableau 1. Concentrations en pectines acides présentes dans les échantillons des différents stades de développement du fruit.

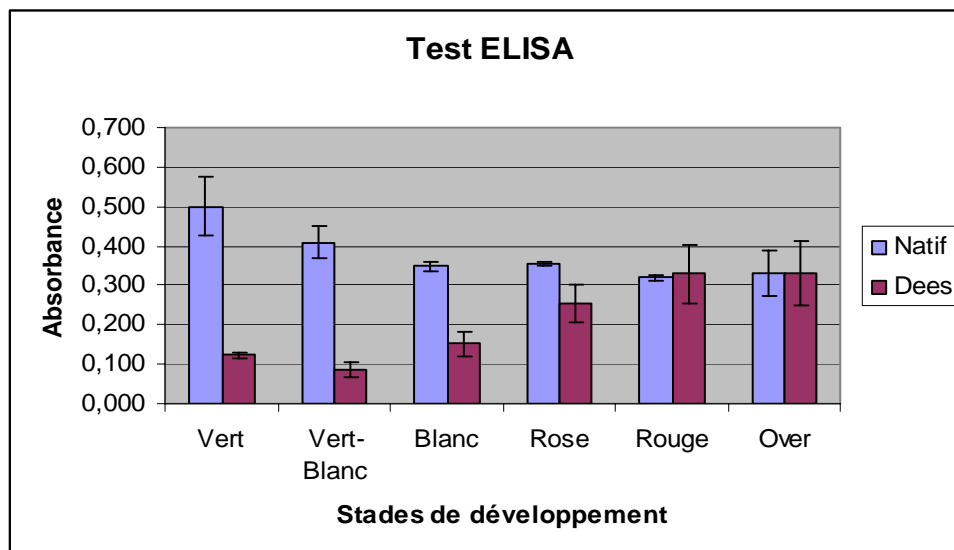


Figure 27. Valeurs d'absorbance mesurées en test ELISA inhibiteur avec l'anticorps 2F4 pour les différents stades de développement du fruit. L'échantillon déestérifié représente la quantité totale de pectine dans l'échantillon. Le test natif représente la quantité de pectine acide à l'état natif dans le broyat. Les valeurs d'absorbance sont inversement proportionnelles à la quantité de pectine acide.

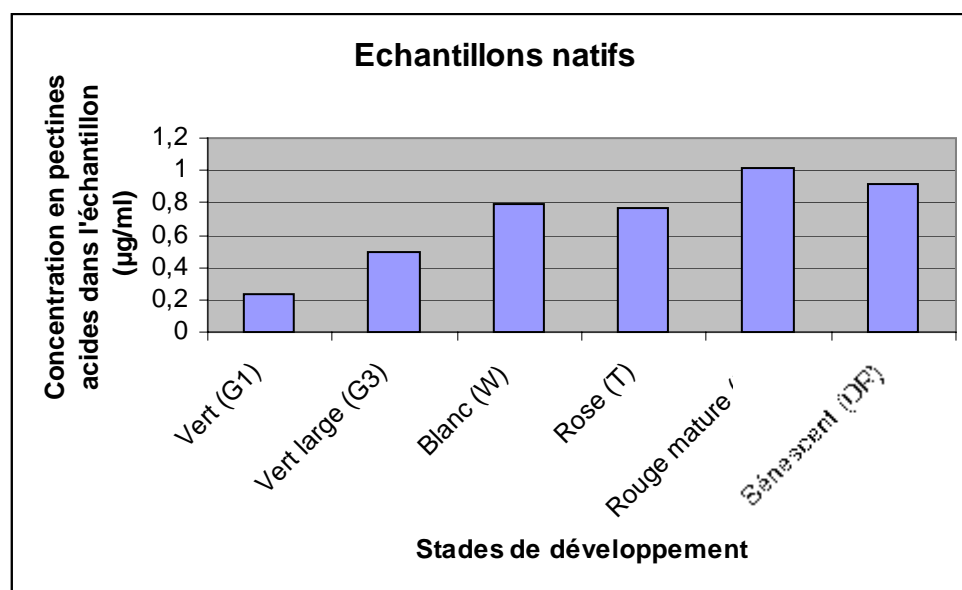


Figure 28. Valeur de concentrations en pectine acide au cours des stades de maturation du fruit.

Tout d'abord, nous avons observé des quantités de pectine totale beaucoup plus importantes dans les stades précoces du développement par rapport aux derniers stades rose, rouge et sénescents. Entre les stades vert G1 et vert G3, une augmentation de la quantité totale de pectine est observée. Le jeune fruit est un organe en croissance et lors des premières semaines suivant l'anthèse, les cellules du réceptacle vont subir de nombreuses divisions. L'augmentation observée pourrait avoir comme origine la néo-synthèse de polysaccharides pectiques lors de la formation des parois des nouvelles cellules. La diminution progressive de la quantité totale en pectine observée depuis le stade blanc jusqu'au stade sénescents, coïncide avec les prémisses du ramollissement observé lors de la maturation de la fraise.

Ainsi nous observons une diminution des concentrations en pectines totales au cours du développement du fruit. Ces résultats nous permettent de penser que lors de la maturation du fruit, le réseau pectique subit des dépolymérisations par des enzymes hydrolytiques.

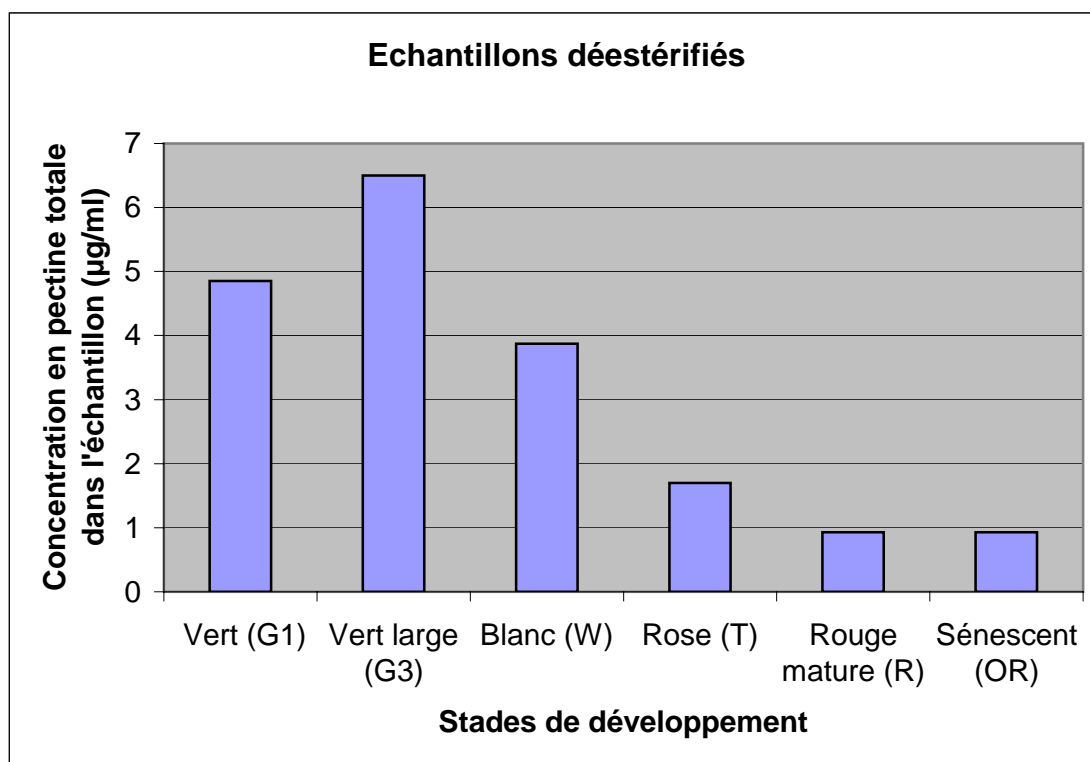


Figure 29. Valeurs de concentration en pectine totale présente au cours de la maturation du fruit

2.1.3.3. Normalisation des résultats et comparaison entre les stades de développement

Afin de comparer les taux de déméthylation des pectines au cours du développement, les résultats obtenus ont été normalisés en réalisant le rapport pectine acide sur pectine totale. Les valeurs ainsi obtenues sont reprises dans le tableau 3 et comparées à la figure 30.

Stades de développement	Pourcentage de pectines déestérifiées par rapport à la quantité de pectine totale
Vert (G1)	4,88 %
Vert (G3)	7,57 %
Blanc (W)	20,46 %
Rose (T)	45,12 %
Rouge mature (R)	108,34 %
Sénescence (OR)	98,67 %

Tableau 3. Rapports pectines acides sur pectines totales mesurés au cours du développement du fruit.

Le pourcentage de déestérification est relativement constant lors des stades précoces du développement du fruit (G1 et G3), avec des valeurs de l'ordre de 4,9 à 7,57 %. Puis ce rapport augmente de façon progressive à partir du stade fruit blanc (W) avec 20,46 % de pectines déestérifiées, jusqu'aux stades rouge mature et sénescence pour lesquels le taux de pectines déestérifiées est de 100 %.

La déméthylation des pectines étant réalisée exclusivement par les PME, nous pouvons supposer d'après les résultats des tests que les pectines hautement méthylées aux stades précoces pourraient être progressivement acidifiées par l'action de ces enzymes au cours du développement de la fraise.

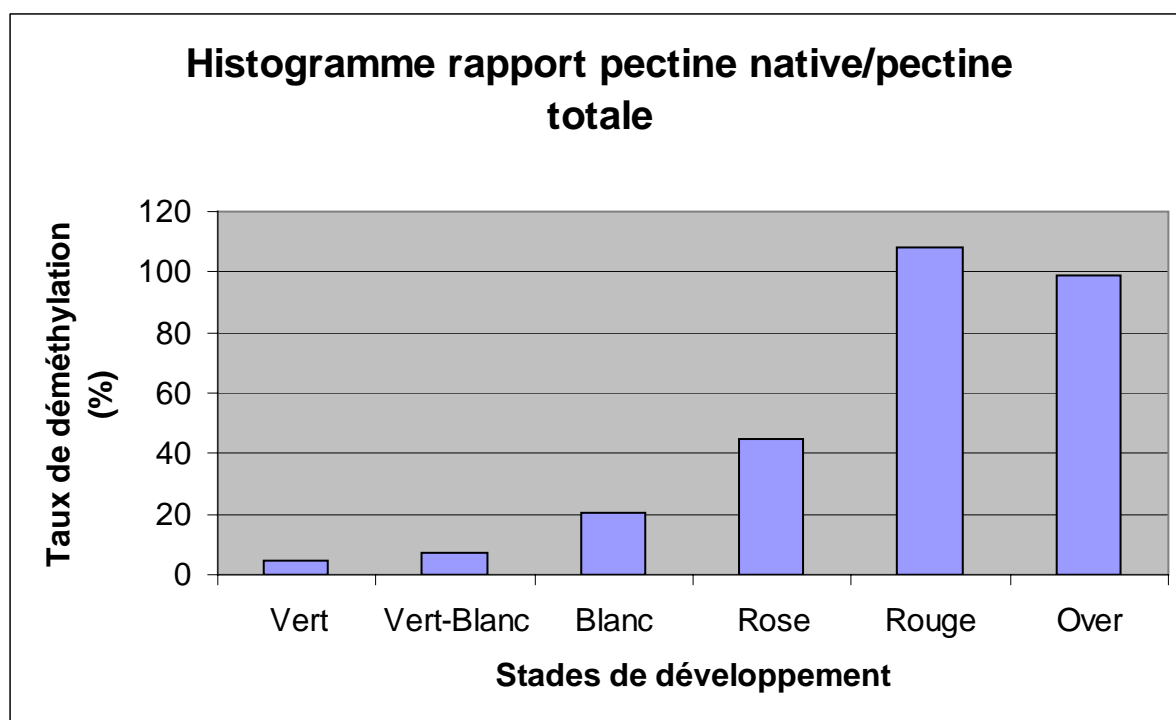


Figure 30. Histogramme des rapports pectines déméthylées/ pectine totale au cours du développement du fruit. Ces pourcentages représentent les taux de méthylation observés au cours du développement.

En conclusion de ces différents tests immunochimiques, nous pouvons émettre l'hypothèse que la diminution de la quantité totale de pectine au cours du développement du fruit, est due à la dégradation du réseau pectique par des enzymes hydrolytique, telles que les pectate lyases, suite à la déméthylation progressive des pectines par les PME.

2.2. Mise en évidence de l'activité PME au cours du développement du fruit

Après l'étude du substrat de la PME, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'enzyme proprement dite, afin de mettre en évidence son activité et la présence éventuelle de différentes isoformes au cours du développement et de la maturation du fruit. Pour ce faire, nous avons tout d'abord vérifié la présence d'activité PME au cours du développement en réalisant un test enzymatique appelé « cup-plate », à partir d'extraits protéiques pariétaux. Nous avons également comparé les activités PME au cours du développement du fruit par un test colorimétrique. Enfin, afin de mettre en évidence la présence potentielle d'isoformes, nous avons entrepris la réalisation d'isoélectrofocalisations.

2.2.1. Extraction et quantification des protéines pariétales

Les PME sont liées de manière ionique à la paroi cellulaire. Le principe d'extraction de protéines pariétales est basé sur les modifications des conditions ioniques dans la paroi (Bordenave, 1996). Tout d'abord, nous avons éliminé les composants cellulaires ainsi que les protéines solubles à l'aide d'un premier tampon d'extraction, de faible concentration en sels. Ensuite, afin d'extraire les protéines de la paroi, un second tampon contenant une forte concentration en sels (NaCl 2 M) a été utilisé. Les extractions ont été réalisées à partir de fruits prélevés aux différents stades de développement (G1, G3, W, T, R et OR) et broyés dans l'azote liquide. Après dialyse contre de l'eau désionisée, les extraits protéiques ont été concentrés soixante fois sur colonne Amicon Ultra d'un cut-off de 5 kDa.

Afin de comparer de manière appropriée les différents stades de développement du fruit, une quantité équivalente de protéines pariétales a été utilisée pour chacun de ceux-ci. En effet, d'après la littérature, la synthèse des protéines se poursuit également lors des derniers stades de maturation de la fraise et reste constante tout au long du développement de celle-ci (Civello, 1996).

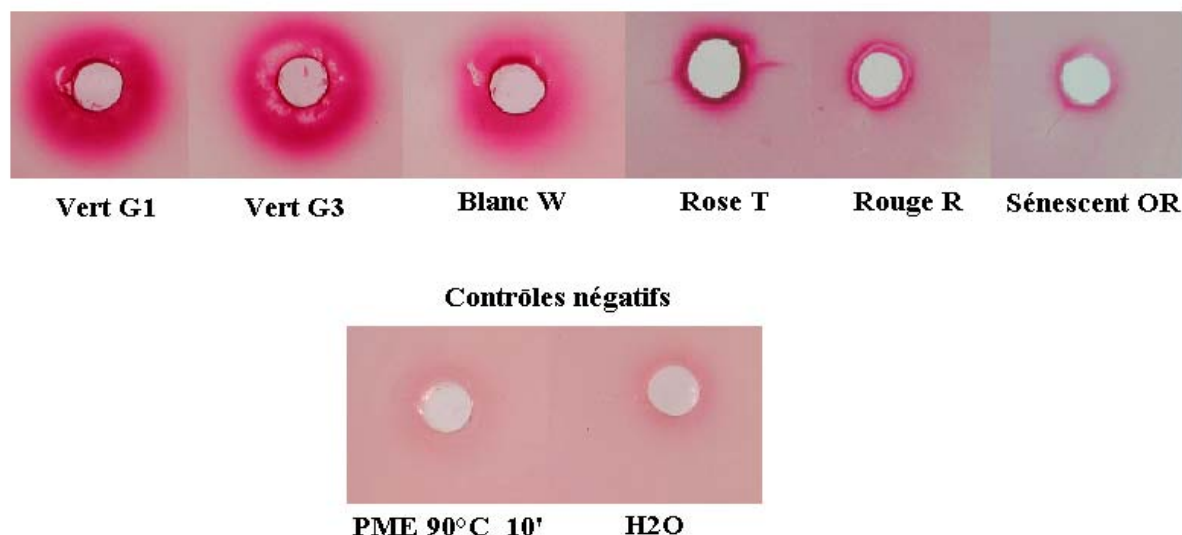


Figure 31. Résultat du test de détection de l'activité PME par « cup plate ». Les protéines ont été incubées pendant 24 h dans un puits creusé dans le gel d'agarose contenant une solution de pectine de Citrus méthylée à 94 %. L'acidification des pectines est mise en évidence par une coloration au rouge de ruthénium. Les extraits protéiques ont été dosés à l'aide du kit NanoOrange (Molecular Probe). Le principe de dosage de ce kit est basé sur l'utilisation d'une molécule non fluorescente qui après interaction avec une protéine va émettre à une longueur d'onde de 590 nm lorsqu'elle est excitée à 485 nm. Une droite d'étalonnage est réalisée avec différentes concentrations en BSA (Bovin Serum Albumin).

2.2.2. Mise en évidence de l'activité pectine méthylestérase au cours du développement du fruit

Afin de mettre en évidence l'activité PME dans les extraits protéiques pariétaux, nous avons réalisé le test enzymatique « cup plate ».

2.2.2.1. Principe du « cup plate »

Le test « cup plate » consiste en la diffusion des protéines de l'extrait pariétal dans un gel d'agarose contenant le substrat pectique méthylestérifié et la mise en évidence de la déméthylation des pectines par coloration des zones acides produites. Ainsi un gel d'agarose 1 % additionné de pectine de Citrus méthylée à 94 % a été coulé en boîte de Pétri. Les échantillons protéiques ont été déposés dans les puits creusés dans le gel et incubés 24h à 25°C. Enfin, l'activité PME a été mise en évidence par coloration au rouge de ruthénium, qui s'adsorbe sur les constituants acides de la pectine.

2.2.2.2. Résultats du « Cup plate »

Les principaux stades de développement du fruit (G1 à OR) ont été testés par « cup plate ». 7 µg de protéines ont été déposés dans des puits creusés dans le gel d'agarose. Après incubation et coloration au rouge de ruthénium, des halos colorés ont été observés en périphérie des puits creusés dans le gel (figure 31). L'intensité ainsi que le diamètre des ces halos diffèrent d'un stade de développement à l'autre : les halos les plus intenses et les plus larges sont observés lors des stades précoces (vert G1 et G3) et diminuent au cours de la maturation du fruit.

Deux contrôles négatifs différents ont été réalisés. Le premier contrôle a consisté en un dépôt d'un échantillon protéique (stade G1) préalablement bouilli pendant 10 minutes, afin de dénaturer les enzymes et donc d'inactiver les PME. Le second contrôle négatif a consisté à ne déposer dans le puit que de l'eau désionisée. Pour chacun de ces contrôles, aucun halo coloré n'a été observé. Ces résultats ont confirmé que les colorations observées précédemment pour les extraits protéiques pariétaux provenaient bien de l'activité enzymatique des PME sur les pectines.

2.2. 3. Comparaison de l'activité PME au cours du développement

Bien que le test « cup-plate » nous ait permis d'observer des variations d'activité PME au cours du développement du fruit, nous avons toutefois réalisé un second test d'activité PME. La comparaison de ces activités a été réalisée par le biais d'un test colorimétrique.

2.2.3.1. Principe du test colorimétrique

Ce test est basé sur le changement de couleur d'une solution contenant un indicateur de pH, le rouge de méthyle. En effet, lors de la déméthylestérification des pectines, des protons H^+ sont libérés, acidifiant ainsi le milieu d'incubation. Le rouge de méthyle est de couleur jaune à pH basique, tandis qu'il vire au rouge à pH acide en passant par des nuances d'orange. La solution de couleur jaune au départ, va donc progressivement passer à une solution de couleur rouge en fonction de l'activité PME. Afin de comparer l'activité PME dans nos différents échantillons protéiques, ceux-ci ont été mis en solution avec de la pectine de Citrus (méthylée à 94%) dans un tampon basique, en présence de l'indicateur de pH. Nous avons réalisé un contrôle positif avec une PME commerciale (Sigma). Deux contrôles négatifs ont également été réalisés afin de vérifier l'absence de variation de coloration de l'indicateur au cours du temps. Le premier contrôle consiste en un extrait protéique bouilli. Le second contrôle est simplement de l'eau désionisée.

2.2.3.2. Résultat du test colorimétrique

Après 24 heures d'incubation à 25°C, une gamme de coloration a été observée pour les différents stades de développement (figure 32). Une couleur rouge intense a été obtenue pour les extraits protéiques des fruits verts (G1 et G3). La coloration est orangée pour les stades blanc (W), rose (T) et rouge mature (R). Toutefois, l'intensité de cette coloration diminue du stade blanc au stade rouge, pour être presque imperceptible au stade sénescence. Enfin, les colorations observées pour les contrôles positifs et négatifs sont celles attendues, à savoir une coloration rouge intense pour le contrôle positif et l'absence de variation de couleur pour les contrôles négatifs.

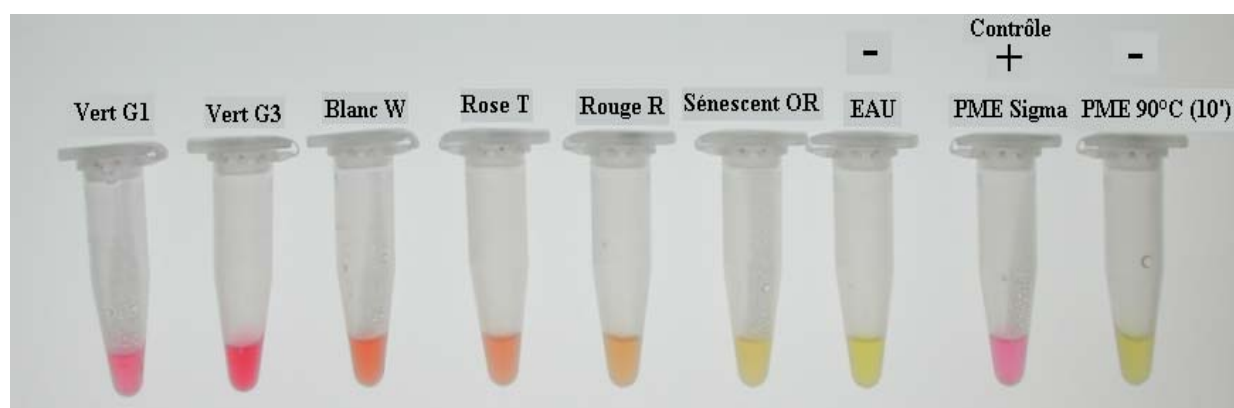


Figure 32. Comparaison de l'activité PME entre les différents stades de développement, par test colorimétrique. L'activité PME au cours du développement du fruit est détectée par la variation de couleur de la solution au cours du temps lors de l'acidification des pectines présentes dans l'extrait.

Les résultats obtenus confirment ainsi les tests « cup plate » dans la mesure où l'activité PME apparaît plus importante dans les premiers stades du développement (G1 et G3) puis diminue lors de la suite du développement de la fraise.

2.2.4 Mise en évidence de l'expression d'isoformes PME par isoélectrofocalisation

Les tests « cup plate » et colorimétrique nous ont permis de vérifier la présence et les différences d'activité des PME au cours des stades de développement du fruit. Nous nous sommes alors intéressés à l'expression éventuelle d'isoformes de cette enzyme. Pour ce faire, nous avons analysé les extraits protéiques pariétaux par isoélectrofocalisation.

2.2.4.1. Principe de l'isoélectrofocalisation

A un pH donné, une protéine possède une charge globale propre qui lui permet de migrer dans un champ électrique. En fonction des changements des conditions environnementales de pH, la charge globale de la protéine va se modifier. Le point isoélectrique (pI) correspond à la valeur de pH à laquelle la charge globale de la protéine est nulle (le nombre de charges négatives est égal au nombre de charges positives tout au long de la molécule). Le principe de l'isoélectrofocalisation (IEF) est basé sur cette propriété.

L'IEF consiste à faire migrer un échantillon protéique au travers d'un gel de polyacrylamide contenant un gradient de pH stabilisé par des ampholines. Les échantillons protéiques déposés sur le gel sont soumis à un champ électrique entre la borne positive (anode) qui est une solution d'acide fort (H_3PO_4 1 M), et la borne négative (cathode) qui est une solution de base forte (NaOH 1 M). Les protéines migrent en fonction de leur charge globale propre le long du gradient de pH et s'immobilisent à l'endroit où cette valeur de pH est égale à leur point isoélectrique (figure 33).

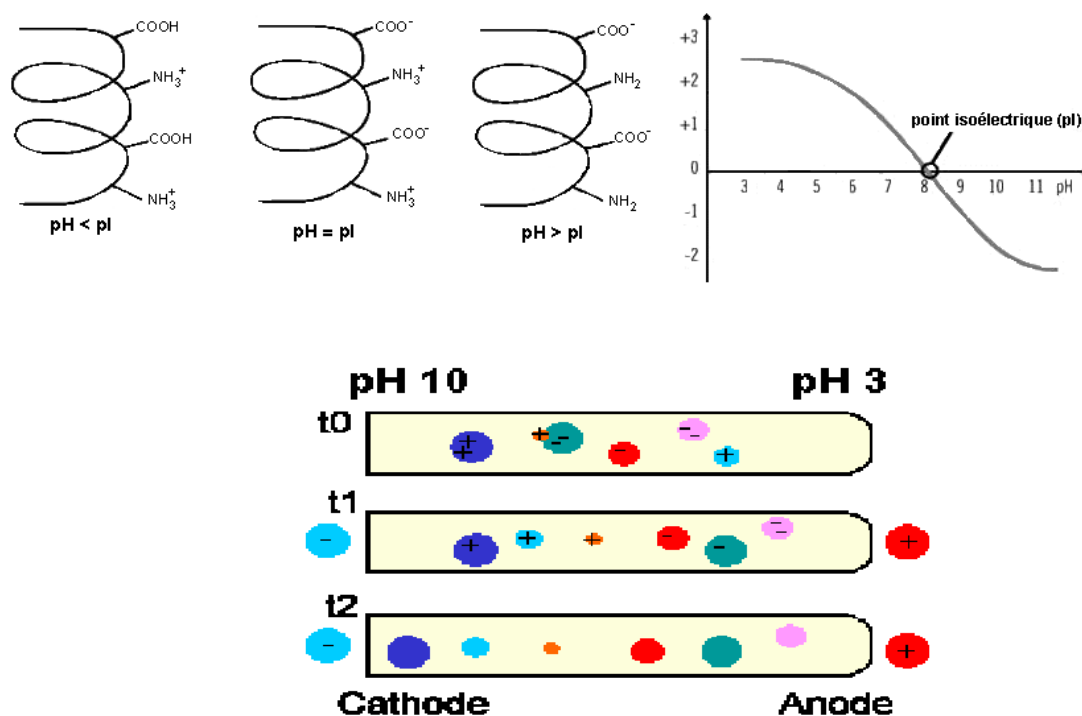


Figure 33. Principe général de l'IEF. Les protéines possèdent une charge globale propre, qui se modifie en fonction du pH (t0). Le point isoélectrique est égal à la valeur de pH dans un gradient, où la charge globale de la protéine est nulle. Si on applique une différence de potentiel dans le gel d'IEF, les protéines vont migrer à travers le gradient de pH (t1) et s'immobiliser lorsque leur charge deviendra nulle, c'est à dire à la valeur de pH = pI de l'isoforme (t2).

2.2.4.2. Résultats de l'isoélectrofocalisation

Les extraits protéiques obtenus aux différents stades de développement du fruit ont été testés par isoélectrofocalisation (IEF). Après un « pré-run » du gel de 20 minutes (mise en place du gradient de pH), 7 µg de protéines (dans 20 µl) ont été déposés sur celui-ci. Un premier « run » d'une heure, avec une différence de potentiel de 40 V/cm entre les bornes positive et négative, a été réalisé afin de faire pénétrer, dans le gel, les protéines déposées à la surface de celui-ci. Un second « run », avec une différence de potentiel de 80 V/cm entre les bornes positive et négative, a été réalisé afin de permettre la migration des protéines et leur stabilisation au niveau de leur point isoélectrique sur le gradient de pH. Après migration, le gel a été équilibré dans une solution tampon à pH 7,6. Le gel a alors été incubé pendant 1h30 dans une solution de pectine de Citrus, méthylestérifiée à 94 %, solubilisée dans un tampon de pH 7,6 (la plupart des pectines méthylestérases caractérisées ayant un optimum de pH proche de 7) et de condition saline optimum pour l'activité PME. Enfin, l'activité PME a été révélée par incubation du gel dans une solution de rouge de ruthénium, et visualisée suivant le même principe que pour le « cup plate ».

Les résultats de l'IEF sont présentés en figure 34. Six isoformes de PME de pI différents et exprimées de manière différentielle, ont été détectées au niveau des régions basiques du gel d'IEF. Pour chacun des stades de développement du fruit, ces 6 isoformes ont été détectées et l'intensité des bandes observées, correspondant à la quantité de pectines déméthylées (dû à l'activité des PME), est plus ou moins importante. Les activités les plus importantes ont été détectées pour les stades précoces (G1 et G3) ainsi que pour le stade blanc (W). Les profils d'IEF pour ces 3 stades paraissent pratiquement identiques. Par contre, une diminution marquée de l'activité des isoformes à partir du stade rose (T) jusqu'au stade sénescence (OR) a nettement été observée. Pour chacun des stades, l'isoforme la plus basique constitue l'isoforme majeure sur le profil d'IEF.

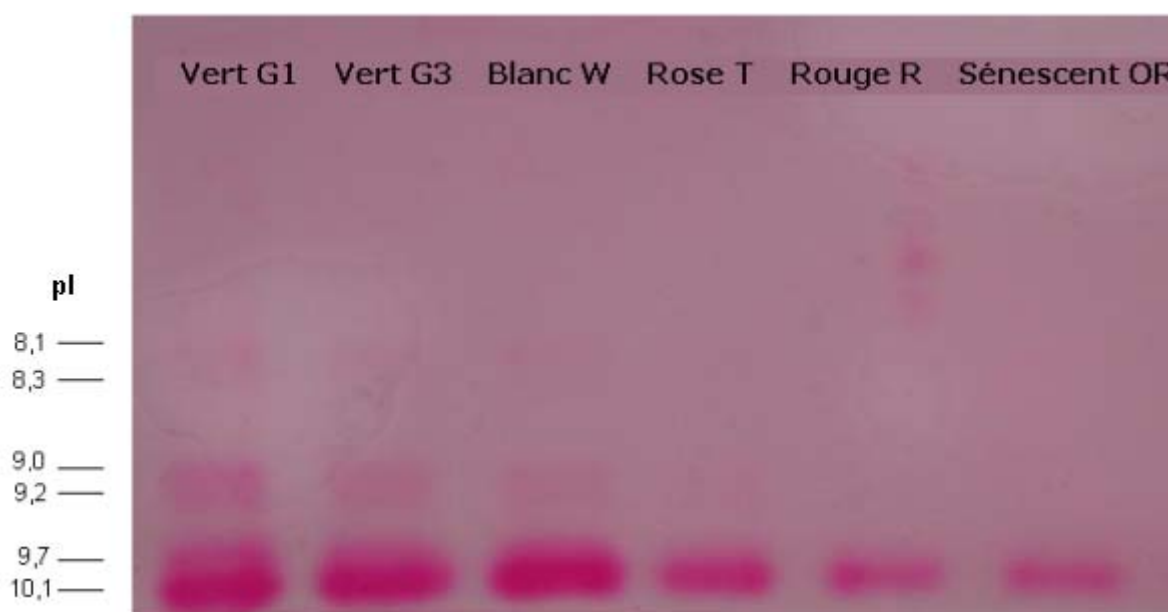


Figure 34. Mise en évidence d'isoformes de PME par isoélectrofocalisation sur des extraits protéiques pariétaux de fruit aux différents stades de développement. 6 isoformes sont détectées dans chacun des stades de développement. L'expression de ces isoformes diminue au cours du temps. Une enzyme peut être présente sous plusieurs isoformes chez un organisme. Les différences principales entre les isoformes se situent au niveau de la taille ou de la composition en acides aminés de leur séquence. Ce polymorphisme a pour conséquence, outre de modifier l'activité, de modifier les propriétés biochimiques de l'enzyme comme par exemple sa charge, sa structure ou encore son pI. Si deux isoformes ont un pI différent, il sera possible de les différencier en fonction de leur profil de migration.

Afin de déterminer le point isoélectrique des isoformes détectées, la linéarité du gradient de pH a été analysée. Des fractions de gel d'1 cm² ont été prélevées le long de la zone de migration et incubées pendant 24h dans de l'eau désionisée à 4°C afin de permettre la diffusion des molécules d'ampholytes. Enfin, le pH de ces différentes solutions a été mesuré à l'aide d'une microélectrode de pH. Les valeurs de point isoélectrique ont été calculées en fonction des valeurs de pH déterminées à partir des fractions de gel (figure 35). Ces valeurs sont reprises dans le tableau 4.

Isoformes	Point isoélectrique déterminé
1	10,1
2	9,7
3	9,2
4	9,0
5	8,3
6	8,1

Tableau 4. Points isoélectriques des différentes isoformes détectées sur le gel d'IEF.

Les intensités des bandes observées sur le gel ont été analysées par le biais d'un programme d'analyse d'image, dans le but de comparer les différences d'activité des isoformes entre elles. Pour ce faire, la superficie occupée par une bande (correspondant à la détection de l'activité PME) a été sélectionnée et l'intensité a été mesurée par l'intermédiaire du programme Quantity One (Biorad). Nous avons retranché à ces valeurs la mesure du bruit de fond du gel. Des mesures ont été effectuées pour l'ensemble des isoformes au cours du développement du fruit.

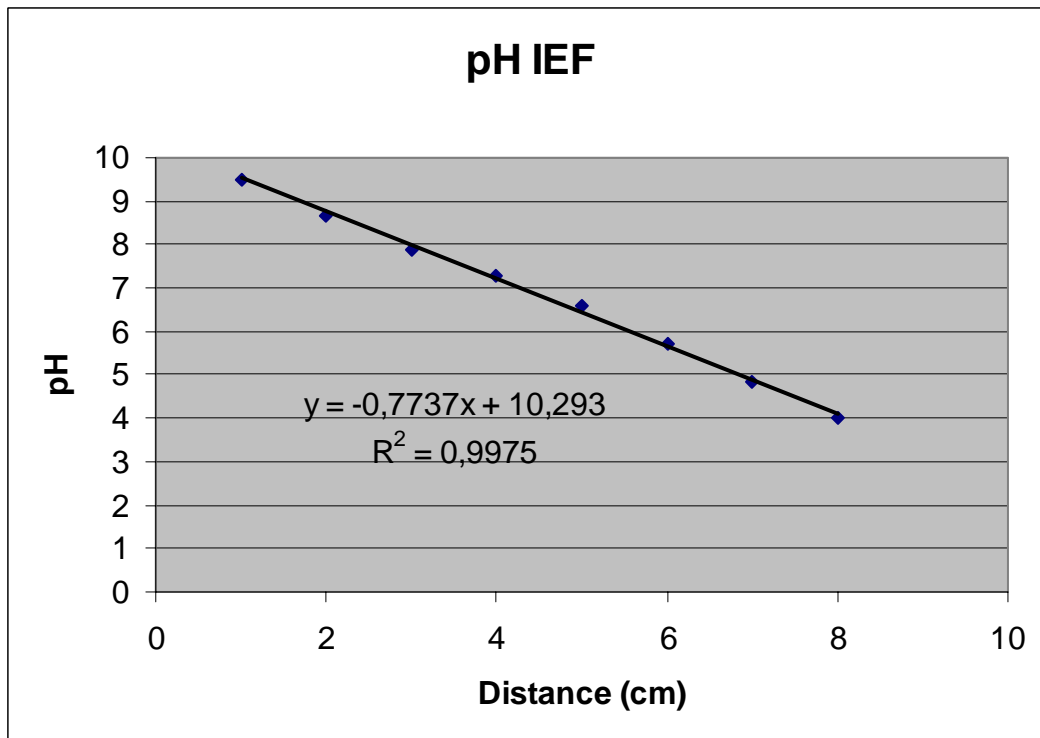


Figure 35. Mise en évidence du gradient de pH le long du gel de polyacrylamide. Les valeurs de pI sont déduites depuis l'équation de la droite.

Les mesures d'intensité obtenues pour chaque isoforme au cours du développement, ont été rapportées en pourcentage par rapport à la valeur maximale d'intensité mesurée pour chaque isoforme. La figure 36 présente les résultats obtenus pour chacune des isoformes au cours du développement. Ces résultats confirment les observations visuelles au niveau du gel. En effet, l'activité de l'isoforme 1, majoritairement exprimée, reste constante lors des trois premiers stades de développement du fruit (93 à 100 %), puis chute à 68 % pour le stade rose, 58 % au stade rouge et moins de 50 % au stade sénescence. En ce qui concerne l'isoforme 2, la diminution d'activité est ici progressive tout au long du stade de développement. De 100 %, elle passe à 65 % au stade blanc et n'est plus que de 43 % et 36 % dans les stades matures et sénescence respectivement. La diminution d'activité des isoformes 3 et 4 suit une même tendance déjà observée pour l'isoforme 2. Enfin les faibles intensités mesurées pour les isoformes 5 et 6 ne nous ont pas permis une analyse cohérente de la variation d'activité de celles-ci.

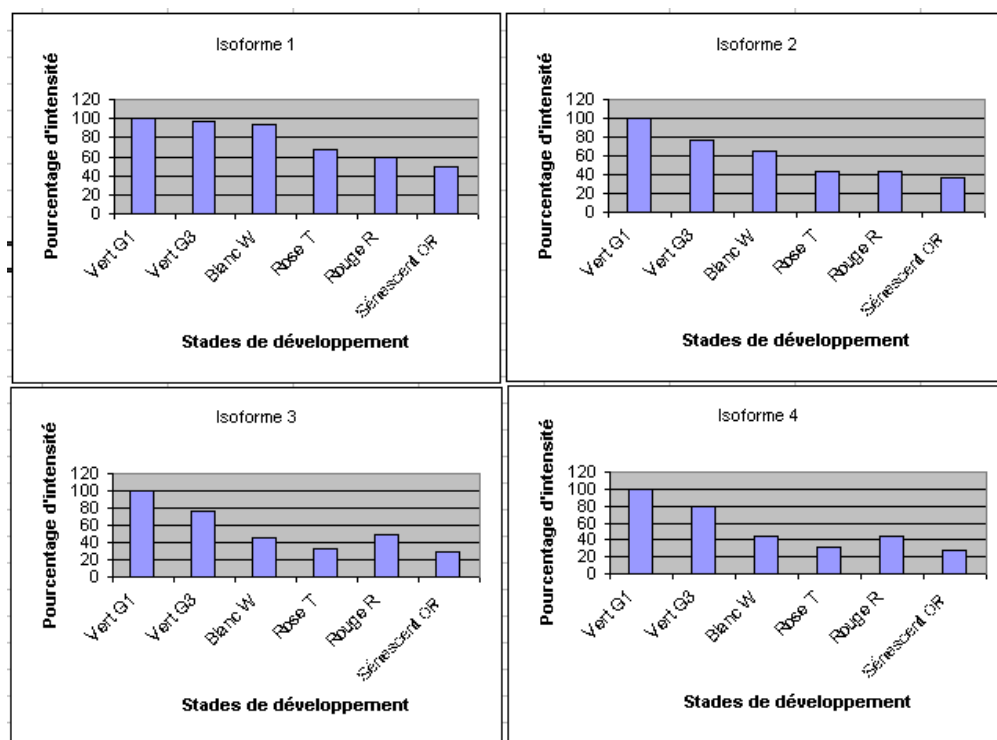


Figure 36. Histogrammes reprenant les pourcentages d'intensité mesurée pour chaque isoforme en fonction des stades de développement. Le pourcentage d'intensité est calculé par rapport à la valeur maximale d'intensité.

Bien que la paroi cellulaire végétale présente généralement un environnement acide dont le pH se situe au environ de 5,5, nous avons entrepris dans un premier temps de travailler dans les conditions de pH optimales pour l'activité PME (pH = 7,6). Afin de vérifier si le pH utilisé pour la mise en évidence de l'activité PME dans le test IEF, pouvait induire des variations de l'activité enzymatique des isoformes précédemment détectées à pH 7,6, une seconde IEF a été effectuée cette fois-ci à pH 5,5. Après migration des échantillons pariétaux, le gel a été équilibré dans un tampon acide pendant 30 minutes, pour être ensuite incubé dans une solution à pH 5,5 de pectine de Citrus méthylestérifiée à 94 %. Les six mêmes isoformes ont été à nouveau détectées. Les tendances des variations d'activité observées sont similaires à celles obtenues pour l'IEF à pH 7,6 et confirment les précédentes observations (données non montrées).

Enfin, afin de vérifier une éventuelle activité de ces isoformes dans d'autres organes de la plante, une IEF a été réalisée avec des extraits pariétaux issus d'organes végétatifs comme les feuilles et les stolons dans les mêmes conditions expérimentales que pour les fruits. Les six isoformes détectées dans le fruit l'ont également été dans ces deux organes avec des profils d'activités comparables à ceux observés chez les fruits verts et blancs (figure 37).

En résumé, ces expériences d'isoélectrofocalisation nous ont donc permis de détecter six isoformes basiques de PME dans tous les stades de développement du fruit. L'activité pectine méthylestérase est maximale et relativement constante au cours des stades précoces, puis diminue lors des derniers stades de maturation du fruit pour atteindre un minimum au stade sénescence. Toutefois, nous avons observé que ces isoformes ne sont pas spécifiquement exprimées dans le fruit et sont présentes dans les organes végétatifs du fraisier.

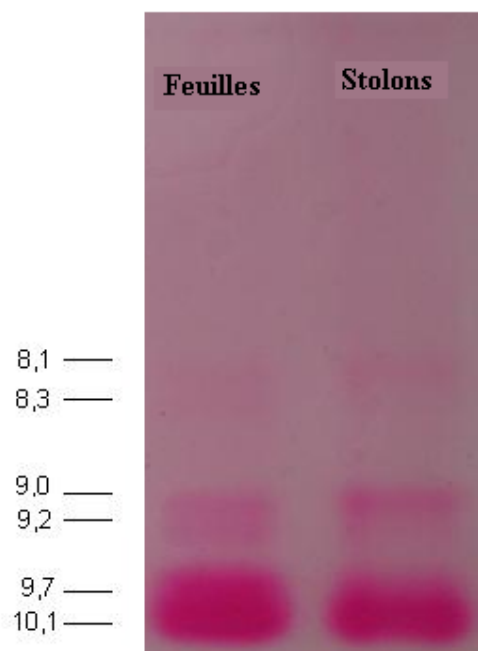


Figure 37. Mise en évidence d'isoformes de PME par isoélectrofocalisation sur des extraits protéiques pariétaux d'organes végétatifs (feuilles et stolons). Six isoformes sont également détectées dans ces extraits pariétaux.

3. Etude moléculaire des PME

Parallèlement à l'étude biochimique présentée ci-dessus, une étude moléculaire a été entreprise afin de cloner une ou plusieurs séquences de PME exprimées lors de la maturation du fruit.

3.1. Obtention de séquences partielles de PME

Les pectines méthylestérases ont une structure de type pré-pro-enzyme. La partie mature de l'enzyme présente 4 zones très conservées dans les séquences de PME végétales (figure 16). Dans un premier temps, nous avons donc entrepris le clonage de séquences partielles de PME bordées par deux de ces zones conservées.

3.1.1. Choix des amorces PCR

Des amorces PCR spécifiques ont été déterminées au niveau des zones conservées de la partie mature de l'enzyme. Le choix s'est porté sur les troisième (GTXDFFIG) et quatrième (YLGRPWK) régions conservées car les caractéristiques des régions conservées 1 et 2 ne permettaient pas de définir des amorces présentant des propriétés biochimiques optimales pour la réalisation des réactions de PCR (T_m , % GC...).

3.1.2. Extraction d'ARN total et synthèse d'ADNc

L'ARN total de fruit au stade rouge mature a été extrait à partir de broyat de tissus avec le kit RNeasy plant minikit (Qiagen). L'extraction a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (figure 38). La présence des ARN ribosomaux, 28S et 18S ainsi que l'absence de dégradation ont été observées, mettant en évidence une extraction correcte de l'ARN total.

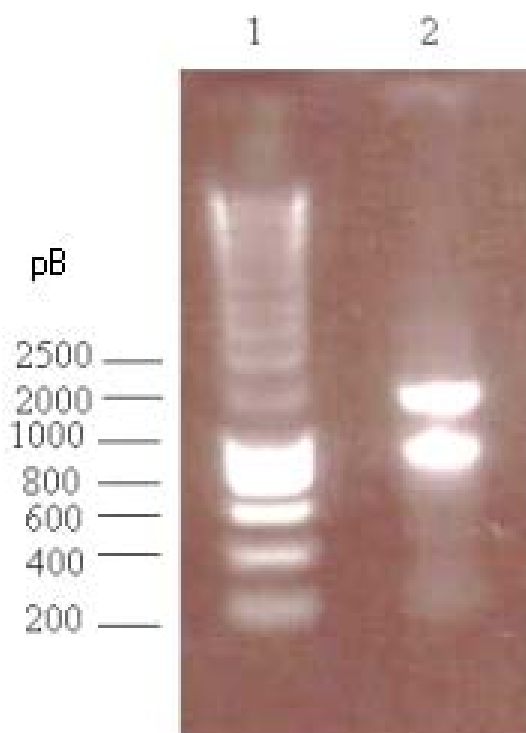


Figure 38. Vérification de l'extraction d'ARN total de fruits rouges. La piste 1 contient le marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec). La piste 2 contient 2 µl d'extrait d'ARN total. Les deux bandes observées sont les ARN ribosomaux 18S et 28S

La synthèse du premier brin d'ADNc a ensuite été réalisée à partir de l'ARN total avec le kit « First-strand cDNA synthesis » de chez Amersham/Pharmacia. Le dosage par spectrométrie à 260 nm de l'extrait d'ARN n'a pas donné de résultat concluant et ce, probablement suite à une interférence entre un des constituants du kit et la détection. Un volume arbitraire d'ARN total a donc été utilisé pour la suite de la synthèse. Un poly-dT de 18 nucléotides a été utilisé comme amorce pour la synthèse du premier brin d'ADNc.

3.1.3 Amplification PCR sur ADNc

Une amplification PCR a été effectuée sur l'ADNc synthétisé précédemment (les cycles d'amplification sont décrits dans le tableau 7). Cette réaction PCR a été vérifiée sur gel d'agarose 1 % (figure 39). Une bande supérieure à 200 pb a été observée sur le gel. La taille obtenue correspond à la taille attendue par comparaison avec les séquences des PME végétales présentes dans les banques de données informatiques (Swissprot, Gen Bank).

Etape	Durée	Température	Nombre de cycles
Dénaturation	1 min	94°C	1
Dénaturation	1 min	94°C	30
Hybridation	1 min	55°C	
Elongation	3 min	72°C	
Elongation finale	10 min	72°C	1

Tableau 7. Programme PCR utilisé pour l'amplification de séquences partielles de PME. L'appareil utilisé est le Minicycler TM de MJ Research, Biozym.

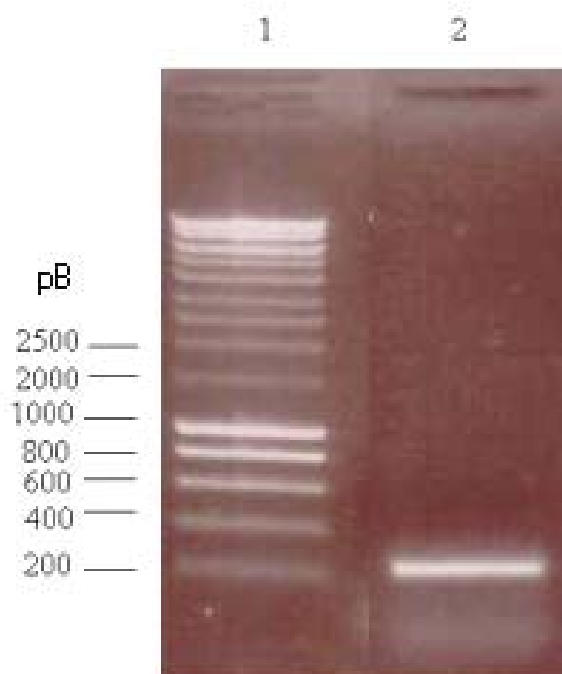


Figure 39. Vérification de la PCR sur ADNc de fruits rouges de Fraisier Calypso avec les amorces PME gauche et droite. La piste 1 contient le marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec). La piste 2 contient 40 µl de produit d'amplification PCR. Une bande aux environs de 250 pb est observée.

3.1.4. Clonage des amplicons dans pCRII et transformation d'*Escherichia coli*

Afin d'analyser les séquences amplifiées, celles-ci ont été clonées en vecteur bactérien. Des bactéries ont ensuite été transformées avec la construction vecteur/insert. Les bactéries sélectionnées ont été testées par PCR afin de vérifier la présence de l'insert. Enfin, ces inserts ont été séquencés.

Pour cloner le produit d'amplification obtenu par PCR dans un vecteur bactérien, la bande correspondant à la taille attendue a été découpée d'un gel d'agarose et purifiée avec le kit QIAEX II (Qiagen). Les séquences purifiées ont ensuite été liguées dans le vecteur pCRII (Invitrogen) (figure 40). Le principe de la ligation repose sur une caractéristique particulière de la Taq polymérase, qui consiste en l'ajout après amplification d'une déoxyadénosine (A) à l'extrémité 3' du produit PCR. Le vecteur pCRII se présente avant à forme linéarisée avec à ses extrémités 3', une déoxythymidine protrudante (T). La ligation a donc été réalisée au niveau de ces bases protrudantes sans restriction préalable. La réaction de ligation a été effectuée à 14°C pendant une nuit.

Des bactéries *Escherichia coli* TOP10F' ont alors été transformées par choc thermique avec le produit de ligation. Le vecteur pCRII possède un gène de résistance à l'ampicilline ainsi que le gène de la β -galactosidase au niveau de son site de clonage. Après transformation, les bactéries ont été étalées sur du milieu

LB contenant de l'ampicilline à une concentration finale de 50 µg/ml ainsi que de l'IPTG (28 µg/ml) et du X-Gal (28 µg/ml) pour la sélection blanc/bleu (test LacZ). Après une incubation d'une nuit à 37°C, les colonies blanches qui se sont développées ont été testées par PCR, avec les amorces spécifiques PME, afin de vérifier la présence de l'insert (figure 41).

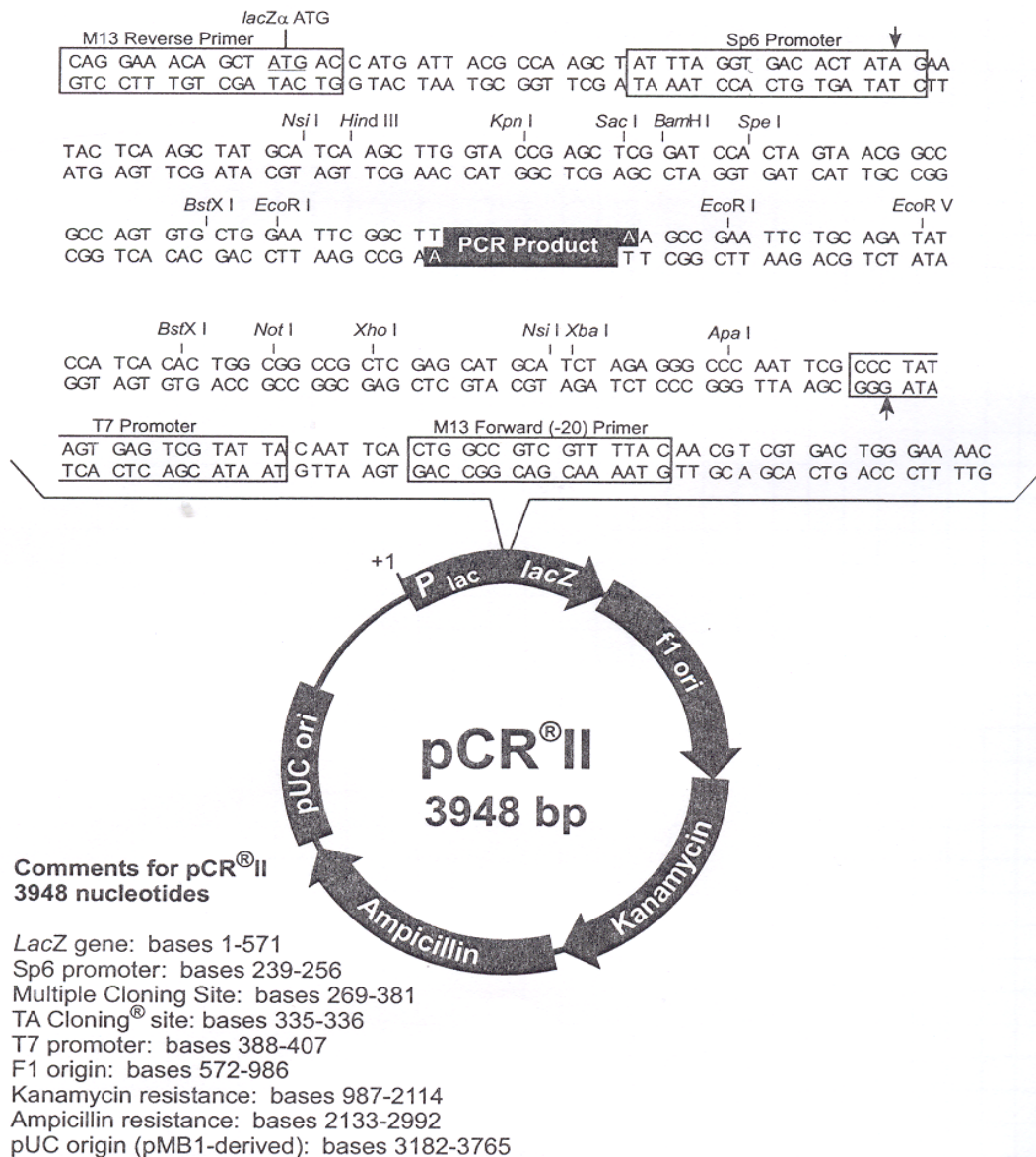


Figure 40. Représentation schématique du vecteur bactérien pCRII. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline ainsi que le gène de la β-galactosidase dans son site de clonage.

3.1.5. Séquençage et analyse de la séquence des inserts

Les inserts présents dans 25 clones positifs ont été séquencés. Pour ce faire, des PCR de pré-séquencage ont été réalisées avec les amorces universelles Forward et Reverse, spécifiques du vecteur et situées en amont et en aval de l'insert à séquencer (figure 42). Les produits PCR ont ensuite été purifiés sur colonne Microcon (Millipore) afin d'éliminer le tampon ainsi que les amorces résiduelles et les dNTP libres dans l'échantillon, ceux-ci pouvant interférer avec la réaction ultérieure de séquençage. Les réactions de séquençage avec les amorces Forward ou Reverse ont été réalisées au laboratoire avec un séquenceur de type Beckman Coulter Ceq 8000 genetic analysis system (8 capillaires).

L'analyse des profils de séquençage a mis en évidence que tous les inserts présents dans les clones testés sont identiques. Cette séquence unique présente une taille de 225 pb. L'analyse par blast de cette séquence

a confirmé son appartenance à la famille multigénique des PME végétales (blastN, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

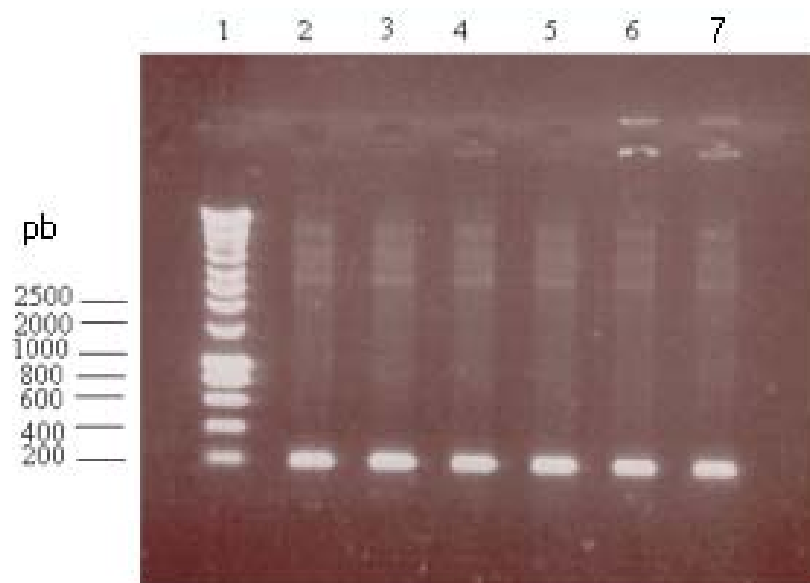
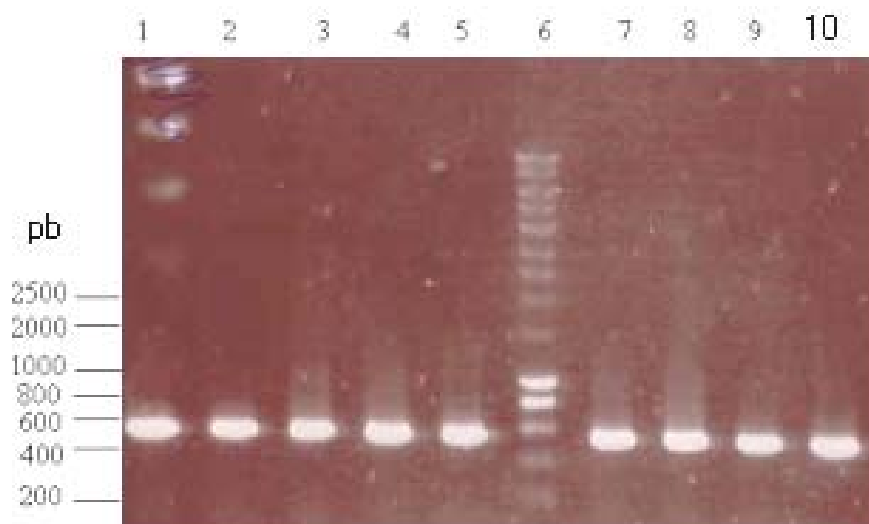


Figure 41. Vérification de la PCR sur clone bactérien TOP10F' transformé avec le vecteur pCRII contenant l'insert PME, avec amorces PME gauche et droite. La piste 1 contient le marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec), les pistes 2 à 7 contiennent 4 µl d'amplification PCR.

Figure 42. Vérification de la PCR sur clone bactérien TOP10F' transformé avec le vecteur pCRII contenant l'insert PME, avec amorces spécifiques du vecteur pCRII forward et reverse. Chargement 10 µl d'échantillon sur gel agarose 1%. Les pistes 1 à 5 et 7 à 10 contiennent 4 µl de produit d'amplification. La piste 6 contient le marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec)



Cette séquence nucléotidique a ensuite été convertie en séquence protéique avec le logiciel « DNA Strider ». Des alignements de cette séquence protéique partielle avec d'autres séquences de PME végétales ont été réalisés à l'aide du programme Vecteur NTI suite 7 (Informax). Un premier alignement a été réalisé avec une série de PME d'organismes végétaux tels la carotte (*Daucus carota* P82218), la pomme de terre (*Solanum tuberosum* AF152172), la pêche (*Prunus persica* X95991), *Arabidopsis thaliana* (NP188048), le raisin (*Vitis vinifera* AY043232), la tomate (*Lycopersicum esculentum* AY046596), le tabac (*Nicotiana tabacum* cab95025) et l'orange (*Citrus sinensis* AAB57670). Plusieurs zones conservées à travers ces organismes ont pu être observées (figure 43). Un second alignement de la séquence partielle avec une PME exprimée lors de la maturation de la tomate (*Lycopersicum esculentum* CAA52703) a également été effectué. Une homologie de 76% est observée entre ces deux séquences (figure 44).

Nous avons également aligné la séquence partielle avec les séquences protéiques des 4 isoformes de PME identifiées et caractérisées chez *Fragaria x ananassa* (cv. Chandler) dans l'article de Castillejo (2004) publié lors de la rédaction de ce manuscrit. Notre séquence présente de l'homologie avec ces 4 isoformes (figure 45). Toutefois, la séquence partielle obtenue lors de ce mémoire correspond à l'isoforme FaPE3 (figure 46), qui pour rappel est l'isoforme dominante à tous les stades de développement du fruit, mais également dans les

organes végétatifs comme les feuilles et stolons. Cette isoforme FaPE3 pourrait jouer un rôle dans le développement des différents organes de la plante. La comparaison de notre séquence partielle avec une autre PME intéressante dans le développement végétatif chez la tomate (AY046396) a mis en évidence l'homologie importante (87 %) entre ces 2 séquences (figure 47).

Notre objectif suivant a été d'obtenir une séquence complète de PME de fraisier Calypso par 3' et 5' RACE PCR.

pme	(1)	-----GTVDF
AF152172	(371)	AVALRVGSDLSAFYKCDILAYQDTLYVHSNRQFFVQCLVAGTVDF
P83218	(114)	AVALRVGSDLSAFYRCDILAYQDSLIVHSNRQFFINCFIAGTVDF
X95991	(314)	AVALRSDLSVYFRCNIRGYQDTLYTHIMRQFYRDCKISGTVDF
AY043232	(324)	AVALRSDLSVYFRCNIRGYQDTLYPHINRQFYRECRISGTVDF
AY046596	(378)	AVALCVGSDLSAFYRCDMLAYQDTLYVHSNRQFFVQCLVAGTVDF
CAB95025	(374)	AVALRVGSDLSAFYRCDILAYQDSLIVHSNRQFFVQCLVAGTVDF
AAB57670	(379)	AVALRVGADLSAFYNCMDMLAYQDTLYVHSNRQFFVNCIAGTVDF
NP_188048	(387)	AVALRVGSDLSAFYNCMDMLAYQDTLYVHSNRQFFVQCLVAGTVDF
Consensus	(406)	AVALRVGSDLSAFYRCDILAYQDTLYVHSNRQFFVQCLVAGTVDF
	451	495
pme	(6)	IFGNAAVVLQNCDIHARKPNSGQKNMLTAQGRTPDPNQNTGIVIQK
AF152172	(416)	IFGNAAVVLQNCDIHARRPGSGQKNMVTAGGRTPDPNQNTGIVIQK
P83218	(159)	IFGNAAVVLQNCDIHARRPGSGQKNMVTAGGRTPDPNQNTGIVIQK
X95991	(359)	IFGDATVVFQNCQILAKKGLPNQKNSITAGGRKDPNEPTGISIQF
AY043232	(369)	IFGDATVVFQNCQILVKKGLPNQKNTITAGGRKDPAPPTGFSIQF
AY046596	(423)	IFGNAAVVLQNCDIHARRPGSGQKNMVTAGGRTPDPNQNTGIVIQK
CAB95025	(419)	IFGNAAVVLQNCDIHARRPGSGQKNMVTAGGRSDPNQNTGIVIQK
AAB57670	(424)	IFGNAAVVLQNCDIHARKPNSGQKNMVTAGGRTPDPNQNTGIVIQK
NP_188048	(432)	IFGNAAVVLQNCDIHARRPNSGQKNMVTAGGRTPDPNQNTGIVIQK
Consensus	(451)	IFGNAAVVLQNCDIHARRPGSGQKNMVTAGGRTPDPNQNTGIVIQK
	496	540
pme	(51)	SRIGATSDLQAV-KGSFKTYLGRPWK-----
AF152172	(461)	CRIGATSDLRPV-QKSFPTYLGRPWK EYSRTVIMQSSITDVIQPA
P83218	(204)	SRIGATSDLQPV-QS SFPTYLGRPWK EYSRTVIMQSSITNVINPA
X95991	(404)	CNITADSDLEAASVNSTPTYLGRPWKLYSRTVIMQSF LSNVIRPE
AY043232	(414)	SNISADSDLLAS-VNSTLSYLGRPWKQYSRTIIMKSYISDAIRPE
AY046596	(468)	CRIGATSDLRPV-QKSFPTYLGRPWK EYSRTVIMQSSITDVIQPA
CAB95025	(464)	CRIGATSDLRPV-QKSFPTYLGRPWK EYSRTVIMQSSITDVINSA
AAB57670	(469)	SRIGATSDLPV-QGSFPTYLGRPWK EYSRTVIMQSSITDLIHPA
NP_188048	(477)	CRIGATSDLQSV-KGSFPTYLGRPWK EYSQTVIMQSAISDVIRPE
Consensus	(496)	CRIGATSDLPV Q SFPTYLGRPWK EYSRTVIMQSSITDVI PA
	541	585

Figure 43. Alignement de la séquence protéique PME partielle de Calypso avec différentes PME végétales : la carotte (*Daucus carota* P82218), la pomme de terre (*Solanum tuberosum* AF152172), la pêche (*Prunus persica* X95991), *Arabidopsis thaliana* (NP188048), le raisin (*Vitis vinifera* AY043232), la tomate (*Lycopersicon esculentum* AY046596), le tabac (*Nicotiana tabacum* CAB95025) et l'orange (*Citrus sinensis* AAB57670). Les régions conservées sont mises en évidence sur cet alignement.

pme	(1)	-----
CAA52703	(316)	AVGQGFILQDICIQNTAGPAKDQ AVALRVGADMSVINRCRIDAYQ
Consensus	(316)	
	361	405
pme	(1)	-----GTVDFIFGNAAVVLQNCDIHARKPNSG
CAA52703	(361)	DTLYAHSQRQFYRDSYVTGTVDFIFGNAAVVFQKQCLVARKPGKY
Consensus	(361)	GTVDFIFGNAAV V Q C I ARKP
	406	450
pme	(28)	QKNMLTAQGRTPDPNQNTGIVIQKSRI GATSDLQAVKGSFKTYLGR
CAA52703	(406)	QQNMVTAQGRTPDPNQATGTSIQFCNIIASSDLEPVLKEFP TYLGR
Consensus	(406)	Q NMLTAQGRTPDPNQ TG IQ I ASSDL V F TYLGR
	451	495
pme	(73)	PWK-----
CAA52703	(451)	PWK EYSRTVVMESYLGLINPAGWAEWDGDFALKTLYYGEFMNNG
Consensus	(451)	PWK

Figure 44. Alignement de la séquence protéique PME partielle de Calypso avec une isoforme de PME de tomate spécifique de la maturation du fruit. On observe 76 % d'homologie entre ces deux séquences.

```

pme      (1) -----GTVDFFIFGNAAVVLQN
AY324809 (316) AFYRCEFRGYQDTLYTHSMRQFYRDCKISGTVDFFIFGDGTVMFQN
AY357182 (1)  --CSGFKGYQDTLYVYSQRQFYRDCKIYGTVDFFIFGDASAILQN
AY357183 (15) AFYRCDILAYQDSLIVHNSNRQFFEGCFIAGTVDFIFGNAAVVLQN
AY357184 (15) VVYRCNIIGYQDTFYVHNSNRQFIRECAIYGTVDFFIFGNAAVVFQN
Consensus (316) YRC  GYQDTLYVHNSNRQFYRDC I GTVDFFIFGNAAVVLQN
                        361                                405

pme      (17) CDIHARKPNSGQKNMLTAQGRITDPNQNTGIVIQKSRIGATSDLA
AY324809 (361) CQILARKALPNQKNSITAHGRKYKDEPTGFSFQFCNISAHPDLA
AY357182 (44)  CNIYVRKPSSNQINTVTAQSRDPNENTGIIHNCRITAAPDLA
AY357183 (60)  CDIHARKPNSGQKNMLTAQGRITDPNQNTGIVIQKSRIGATSDLA
AY357184 (60)  CSIIFARKPMFPQKNTITAGNRKDPNQNTGMSIHACRIILATPDLEP
Consensus (361) C I HARKP S QKNTITAGRKDPNQNTGIVIQ CRI ATPDL A
                        406                                450

pme      (62) VKG--SFKTYLGRPWK-----
AY324809 (406) TPNVNSTPTTYLGRPWKEYSRTIIMQSFMSNMIKPAGWLEWNGDMF
AY357182 (89)  VQG--SFRTYLGRPWQKYSRVVIMKSNLDGLIAPQGWFPWGSFG
AY357183 (105) VKG--SFKTYLGRPWKEYSRTVIMQSSITDIIDPAGWYEWSGTFA
AY357184 (105) VKG--SFTFLGRPWKMYSRVVYMLSYIGDHVQPRGWLEWNTTFA
Consensus (406) VKG  SFKTYLGRPWK YSR VIM S I  II P GW EW GTFA

```

Figure 45. Alignement de la séquence protéique PME partielle de Calypso avec les quatre isoformes de PME *Fragaria x ananassa* (cv. Chandler) décrites dans l'article de Castillejo (2004).

```

1                                45
pme      (1) -----GT
AY357183 (1) KHQAVALRVGSDLSAFYRCDILAYQDSLIVHNSNRQFFEGCFIAGT
Consensus (1) -----GT
46                                90
pme      (3) VDFIFGNAAVVLQNCIDIHARKPNSGQKNMLTAQGRITDPNQNTGIV
AY357183 (46) VDFIFGNAAVVLQNCIDIHARKPNSGQKNMLTAQGRITDPNQNTGIV
Consensus (46) VDFIFGNAAVVLQNCIDIHARKPNSGQKNMLTAQGRITDPNQNTGIV
91                                135
pme      (48) IQKSRIIGATSDLAQVKGSEFKTYLGRPWK-----
AY357183 (91) IQKSRIIGATSDLAQVKGSEFKTYLGRPWKEYSRTVIMQSSITDIID
Consensus (91) IQKSRIIGATSDLAQVKGSEFKTYLGRPWK
136                                180
pme      (76) -----
AY357183 (136) PAGWYEWSGTFALDTLFYAEYANTGAGASTSNRVTWKGYKVITSA
Consensus (136) -----
181                                209
pme      (76) -----
AY357183 (181) TEAQAFTPGNFIAGGSWLSATGFPFTLGL
Consensus (181) -----

```

Figure 46. Alignement de la séquence protéique PME partielle avec l'isoforme FaPE3. On observe 100 % d'homologie entre ces deux séquences.

```

406                                450
pme      (1) -----GTVDFFIFGNAAVVLQNCIDIHARKPNSGQKNMLT
AY046596 (406) SNRQFFVQCLVAGTVDFIFGNGAAVFDQCDIHARRPGSQKNMVT
Consensus (406) -----GTVDFFIFGNA V Q CDIHARKP SGQKNMLT
451                                495
pme      (34) AQGRITDPNQNTGIVIQKSRIGATSDLAQVKGSEFKTYLGRPWK---
AY046596 (451) AQGRITDPNQNTGIVIQKCRIGATSDLRPVQKSFPTYLGRPWKEYS
Consensus (451) AQGRITDPNQNTGIVIQK RIGATSDL V SF TYLGRPWK
496                                540
pme      (76) -----
AY046596 (496) RTVIMQSSITDVIQPAWHEWNGNFALDTLFYGEYANTGAGAPTS
Consensus (496) -----
541                                583
pme      (76) -----
AY046596 (541) GRVKWKGHKVITSSTEQAAYTPGRFIAGGSWLSSTGFPFSLGL
Consensus (541) -----

```

Figure 47. Alignement de la séquence protéique PME partielle avec une PME spécifique du stade de développement chez la tomate. On observe 86% d'homologie entre ces deux séquences

3.2. Réaction RACE

Le but de cette expérience est d'obtenir les séquences 3' et 5' bordant notre séquence partielle de 225 pb. Pour ce faire, nous avons utilisé le kit Marathon cDNA (Bd-Bioscience).

3.2.1. Principe du 3' et 5' RACE (kit Marathon cDNA Bd-Bioscience)

Le principe du kit Marathon est le suivant (Figure 24). Tout d'abord, l'ARN total est extrait des tissus étudiés. Les deux brins d'ADNc sont synthétisés à partir de la matrice d'ARN. Des adaptateurs spécifiques de séquences connues sont alors liés à cette matrice d'ADNc au niveau des extrémités 3' et 5'. Des amorces spécifiques de la séquence cible et des adaptateurs sont utilisés pour une première amplification PCR. Enfin, une seconde PCR, avec des amorces internes, est réalisée dans le but d'augmenter la spécificité des amplifications obtenues.

3.2.2. Résultats des 3' et 5' RACE PCR

Après extraction d'ARN total des fruits prélevés au stade rouge, la synthèse des deux brins d'ADNc ainsi que la ligation des adaptateurs ont été réalisées. Une première PCR a été réalisée sur les mélanges de ligation des adaptateurs dilués 50 et 250 X avec la polymérase Expand (Roche). Aucune amplification n'a été observée après la première PCR. Les secondes réactions PCR ont été réalisées avec les amorces internes (figure 48 a et b) sur les produits de réaction de la première PCR avec la polymérase Expand (Roche). Nous avons observé, après migration des produits PCR sur gel d'agarose 1 %, une bande aux environs de 600 pb pour la partie 3' et une bande située aux environs de 300 pb pour la partie 5' de la séquence. Les programmes RACE PCR sont repris dans le tableau 8.

Nombre de cycles	RACE PCR 1	RACE PCR 2
1 cycle	94°C 1 minute	94°C 1 minute
5 cycles	94°C 30 secondes	
	75°C 3 minutes	
5 cycles	94°C 30 secondes	
	70°C 4 minutes	
20-25 cycles	94°C 20 secondes	94°C 30 secondes
Terminaison	68°C 4 minutes	68°C 4 minutes
	68°C 10 minutes	68°C 10 minutes

Tableau 8. Détail des programmes RACE PCR utilisés.

Les amplifications obtenues ont été purifiées du gel d'agarose et insérées dans le vecteur bactérien pCRII. Des bactéries *E. coli* Top10F' ont alors été transformées par choc thermique avec les constructions vecteurs/inserts. Les bactéries sélectionnées sur milieu LB (contenant de l'ampicilline, et de l'X-Gal avec de l'IPTG pour le test blanc/bleu) ont été testées par PCR avec les amorces spécifiques des inserts 3' et 5' (figure 49). Les inserts présents dans les clones bactériens positifs ont ensuite été séquencés au laboratoire.

Tout comme pour la séquence partielle, les clones 3' présentent une séquence identique. Il en est de même pour les clones 5'. Les séquences 3', 5' et partielle ont été alignées afin de reconstituer une séquence unique. Celle-ci a une taille de 720 pb et est complète jusqu'à la queue de polyA. Toutefois, seulement environ 70 pb ont pu être obtenues en 5'. La figure 50 représente la séquence protéique déduite du RACE alignée avec la séquence partielle.

Cette séquence protéique RACE a été comparée par alignement avec la séquence protéique de PME de carotte (*Daucus carota* P82218) publiée par Johansson et ses collaborateurs (2002), dont le site actif a été caractérisé. Cet alignement nous a permis de situer précisément sur notre séquence, les deux résidus aspartate (D) et un des deux résidus glutamine (Q) qui constituent une partie du site actif de l'enzyme PME (figure 51).

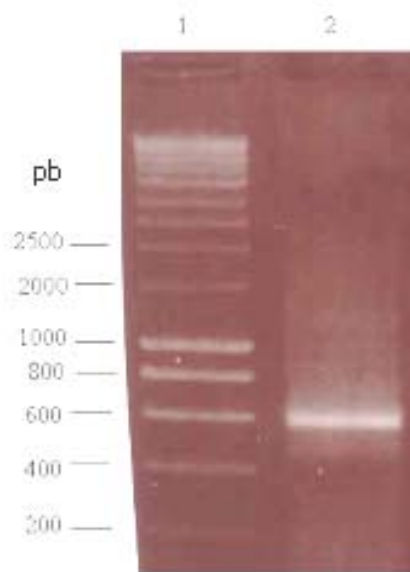


Figure 48a. Vérification de la réaction RACE côté 3' sur ADNc de fruits rouges de fraiser Calypso. La piste 1 contient le marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec). La piste 2 contient 40 μ l de produit RACE 3'. On observe une bande à 600 pb

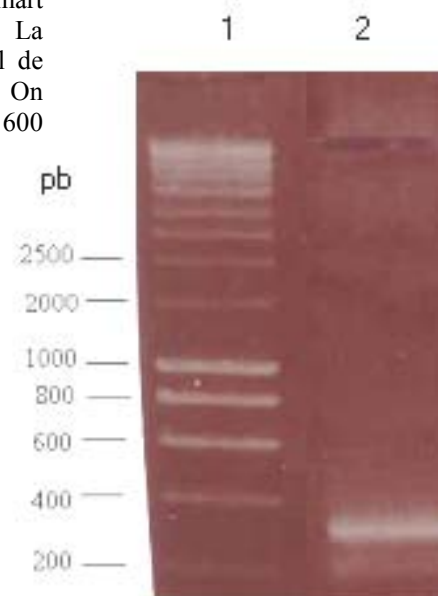


Figure 48b. Vérification de la réaction RACE côté 5' sur ADNc de fruits rouges de fraiser Calypso. La piste 1 contient le marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec). La piste 2 contient 40 μ l de produit RACE 5'. On observe une bande aux environs de 300 pb

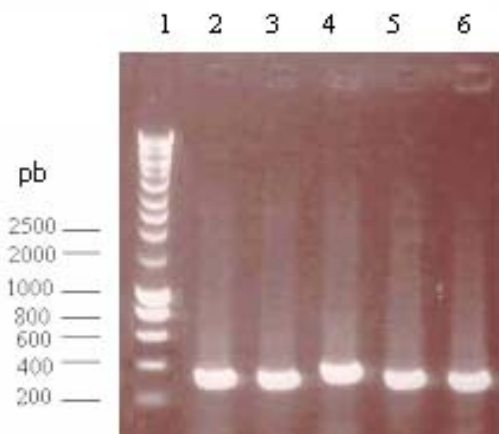
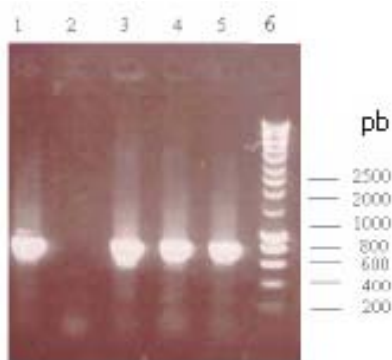


Figure 49. Vérification de la PCR sur clone bactérien TOP10F⁺ transformé avec le vecteur pCRII contenant les inserts RACE 3' et 5', avec amorces spécifiques AP2 et D2 ou G2. Chargement de 10 μ l d'échantillon sur gel agarose 1%. Les pistes 1 à 5 (photo 1) contiennent l'amplification en 3' (bandes positives à 600 pb). Les pistes 2 à 6 (photo 2) contiennent l'amplification 5' (bandes positives à 400 pb). Les pistes 6 et 1 de la 1^{ère} et 2^{ème} photo respectivement contiennent le marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec).

Enfin, l'alignement de la séquence protéique partielle RACE avec l'isoforme FaPE3 a confirmé la similitude existant entre ces deux isoformes (figure 52)

1			45
pme	(1)	-----	GTVDFFIFGNAAVVLQNCIDIHA
race	(1)	DILAYQDSLYVHSNRQFFEGCFTAGTVDDFFIFGNAAVVLQNCIDIHA	
Consensus	(1)		GTVDFFIFGNAAVVLQNCIDIHA
		46	90
pme	(22)	RKPNSGQKNMLTAQGRTPNQTGIVIQSRIGATSDLQAVKGSF	
race	(46)	RKPNSGQKNMLTAQGRTPNQTGIVIQSRIGATSDLQAVKGSF	
Consensus	(46)	RKPNSGQKNMLTAQGRTPNQTGIVIQSRIGATSDLQAVKGSF	
		91	135
pme	(67)	KTYLGRPWK-----	
race	(91)	KTYLGRPWKEYSRTVIMQSSITDIIDPAGWYEWSGTFALDTLFYA	
Consensus	(91)	KTYLGRPWK	
		136	180
pme	(76)	-----	
race	(136)	EYANTGAGASTSNRVTWKGYKITSATEAQAFTPGNFIAGGSWLS	
Consensus	(136)		
		181	225
pme	(76)	-----	
race	(181)	ATGFPPFTLGLZNVARZVISCVEZVCCFGRDRSIDQDTAICWLMN	
Consensus	(181)		
		226	239
pme	(76)	-----	
race	(226)	KSILFQKKKKKKKK	
Consensus	(226)		

Figure 50. Alignement séquence protéique partielle avec Séquence protéique PME obtenue en RACE. L'homologie est parfaite entre ces deux séquences. En 3' on arrive jusqu'à la queue polyA de l'ARN messager (KKKKKKK). En 5' on remonte 27 acides aminés en amont de la séquence partielle.

		91	135
P83218	(91)	AVGAGFLARDITFQNTAGAAKHQAVLRVGSDDLAFYRC	DILAYQ
race	(1)	-----	DILAYQ
Consensus	(91)		DILAYQ
		136	180
P83218	(136)	DSLYVHSNRQFFINCFIAGTVDDFFIFGNAAVVLQDCDIHARRESG	
race	(7)	DSLYVHSNRQFFEGCFIAGTVDDFFIFGNAAVVLQNCDIHARKENSG	
Consensus	(136)	DSLYVHSNRQFF CF AGTVDDFFIFGNAAVVLQ CDIHARKP SG	
		181	225
P83218	(181)	QKNMVTAGGRTPNQTGIVIQSRIGATSDLQPVQSFPTYLGR	
race	(52)	QKNMLTAQGRTPNQTGIVIQSRIGATSDLQAVKGSFKTYLGR	
Consensus	(181)	QKNMLTAQGRTPNQTGIVIQSRIGATSDLQ V SF TYLGR	
		226	270
P83218	(226)	PWKEYSRTVVMQSSITNVINPAGWFPWDGNFALDTLYYGEYNTG	
race	(97)	PWKEYSRTVIMQSSITDIIDPAGWYEWSGTFALDTLFYAEYNTG	
Consensus	(226)	PWKEYSRTVIMQSSIT II PAGWF W G FALDTLFYAEY NTG	
		271	315
P83218	(271)	AGAATSGRVTWKGFKVITSSTEAGFTPGSFIAGGSWLKATFPF	
race	(142)	AGASTNRVTWKGKVKITSATEAQAFTPGNFIAGGSWLSATGFPF	
Consensus	(271)	AGAATS RVTWKGFKVITSATEAQAFTPG FIAGGSWL AT FPF	
		316	360
P83218	(316)	SLGL-----	
race	(187)	TLGLZNVARZVISCVEZVCCFGRDRSIDQDTAICWLMNKSILFQ	
Consensus	(316)	SLGL	
		361	

Figure 51. Alignement séquence protéique PME obtenue en RACE avec la PME de carotte. Cet alignement permet de situer précisément sur notre séquence, les deux résidus aspartate (D) et un des deux résidus glutamine (Q) qui constituent une partie du site actif de l'enzyme PME (en jaune).

1			45
race	(1)	-----DILAYQDSLYVHSNRQFFEGCF	AGT
AY357183	(1)	KHQAVALRVGSDLSAFYRC	DILAYQDSLYVHSNRQFFEGCF
Consensus	(1)		DILAYQDSLYVHSNRQFFEGCF AGT
		46	90
race	(27)	VDFIFGNAAVVLQNCDIHARKPNSGQKNMLTAQGRTPNQNTGIV	
AY357183	(46)	VDFIFGNAAVVLQNCDIHARKPNSGQKNMLTAQGRTPNQNTGIV	
Consensus	(46)	VDFIFGNAAVVLQNCDIHARKPNSGQKNMLTAQGRTPNQNTGIV	
		91	135
race	(72)	IQKSRIGATSDLQAVKGSFKTYLGRPWKEYSRTVIMQSSITDIID	
AY357183	(91)	IQKSRIGATSDLQAVKGSFKTYLGRPWKEYSRTVIMQSSITDIID	
Consensus	(91)	IQKSRIGATSDLQAVKGSFKTYLGRPWKEYSRTVIMQSSITDIID	
		136	180
race	(117)	PAGWYEWSGTFALDTLFYAAYANTGAGASTSNRVTWKGYKVITSA	
AY357183	(136)	PAGWYEWSGTFALDTLFYAAYANTGAGASTSNRVTWKGYKVITSA	
Consensus	(136)	PAGWYEWSGTFALDTLFYAAYANTGAGASTSNRVTWKGYKVITSA	
		181	225
race	(162)	TEAQAFTPGNFIAGGSWLSATGFPFTLGLZNVARZVISCVEZVC	
AY357183	(181)	TEAQAFTPGNFIAGGSWLSATGFPFTLGL-----	
Consensus	(181)	TEAQAFTPGNFIAGGSWLSATGFPFTLGL	

Figure 52. Alignement séquence protéique PME obtenue en RACE avec l'isoforme FaPE3. L'homologie observée sur cet alignement est de 99,5 %.

4. Transformation de fraisiers avec une construction ARNi-PME

La comparaison entre la séquence partielle de PME (225 pb) de fraisier Calypso et une séquence partielle précédemment obtenue chez la variété Elsanta, a mis en évidence une parfaite identité (100 %) entre ces deux séquences. Dans le but d'étudier l'action *in situ* des PME lors du développement du fruit de Calypso, la transformation de fraisiers maintenus en culture *in vitro* a été entreprise avec une construction ARN interférent, précédemment réalisée au laboratoire avec cette séquence d'Elsanta.

Dans un premier temps, du matériel végétal a été régénéré en culture *in vitro* à partir de fraisiers Calypso cultivés en terre. Ce matériel a été multiplié et maintenu en chambre de culture thermostatée. Enfin, des transformations ont été réalisées avec *Agrobacterium tumefaciens* et des plantules sont en cours de régénération.

4.1. Obtention du matériel végétal en culture *in vitro*

Le choix de la variété Calypso pour notre recherche a été dicté par sa grande capacité à régénérer des plantules à partir d'explants foliaires.

L'obtention de matériel *in vitro* a été entreprise à partir de jeunes feuilles de fraisiers Calypso maintenu en terre. Celles-ci ont été prélevées sur les fraisiers puis stérilisées dans une solution de 0,052 % d'hypochlorite de sodium pendant 20 minutes. Ces explants ont ensuite été rincés avec de l'eau désionisée stérile. Enfin, les feuilles ont été découpées en rectangles de quelques cm² puis déposés sur le milieu de régénération stérile ZD102 contenant les hormones végétales TDZ (une cytokinine) à 1 mg/l et 2,4-D (une auxine) à 0.2 mg/l.

Le développement des premiers cals a été observé après environ deux semaines de culture à 25°C en chambre thermostatée. Après environ deux mois, les premières formations de tiges et de feuilles ont été détectées. Lors des semaines suivantes, les plantules régénérées se sont développées. Celles-ci ont ensuite été séparées des cals, individualisées et repiquées sur milieu de culture B5 ne contenant pas d'hormones végétales.

Enfin, la multiplication des plantules régénérées a été obtenue sur milieu de multiplication contenant de l'auxine (IBA à 1 mg/l), de la cytokinine (BAP à 0.5 mg/l) et une hormone de type gibbérelline (GA₃ à 0.1 mg/l).

4.2. Transformation des fraisiers par *Agrobacterium tumefaciens*

Nous avons signalé que la séquence partielle obtenue à partir de la variété Calypso, présentait 100 % d'identité avec une séquence partielle clonée de la variété Elsanta. Une construction ARN interférent dirigée contre cette séquence de PME d'Elsanta ayant précédemment été réalisée au laboratoire (M. Draye), nous avons entrepris la transformation de fraisiers Calypso avec cette construction.

4.1.1. La transformation végétale et le mécanisme de l'ARN interférent

Avec le développement de la biologie moléculaire et des biotechnologies, il est devenu possible de modifier le génome d'une plante et d'y introduire des caractères particuliers sans passer par des croisements parfois laborieux, voire impossibles.

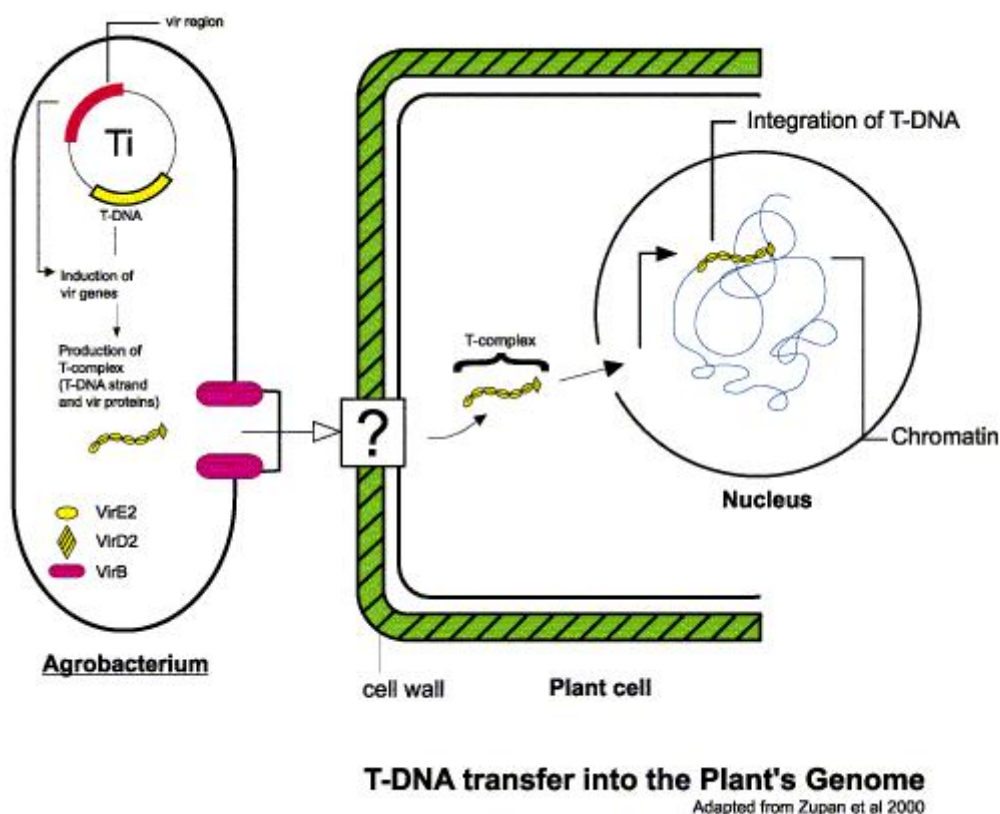


Figure 53. Représentation schématique de la transformation des cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens*.

La transformation par *Agrobacterium tumefaciens* exploite un mécanisme naturel par lequel une bactérie infecte et transforme une plante (figure 53). Cette attaque produit ce que l'on appelle la « galle du collet ». Elle forme un tissu désorganisé qualifié de tumeur végétale. La bactérie transfère une portion d'ADN située sur son plasmide Ti, qui va s'intégrer dans le génome de la plante. Cet ADN-T (pour transfert) contient les gènes responsables de la maladie. Toutefois, ceux-ci ne sont pas nécessaires pour le transfert. Cette portion d'ADN peut donc être remplacée par la séquence d'intérêt sans que l'intégration n'en soit affectée. Le plasmide Ti sans ces gènes est dit « désarmé ». Les gènes essentiels au transfert du T-DNA n'étant pas transférés vers la plante et ceux-ci agissant en « trans » sur la région du T-DNA, il n'est donc pas nécessaire que cette région soit située sur le même plasmide que celui contenant l'ADN-T. Les infections sont dès lors réalisées avec un système binaire de vecteur : l'un portant l'ADN-T contenant la construction à intégrer et l'autre portant les gènes de transfert et d'intégration. Dans nos expérimentations, un système tertiaire a été utilisé afin de transformer les fraisiers. Celui-ci consiste, outre les deux vecteurs « classiques », en la présence d'un troisième vecteur portant une construction surexprimant un des gènes responsables du transfert de l'ADN-T, VirG.

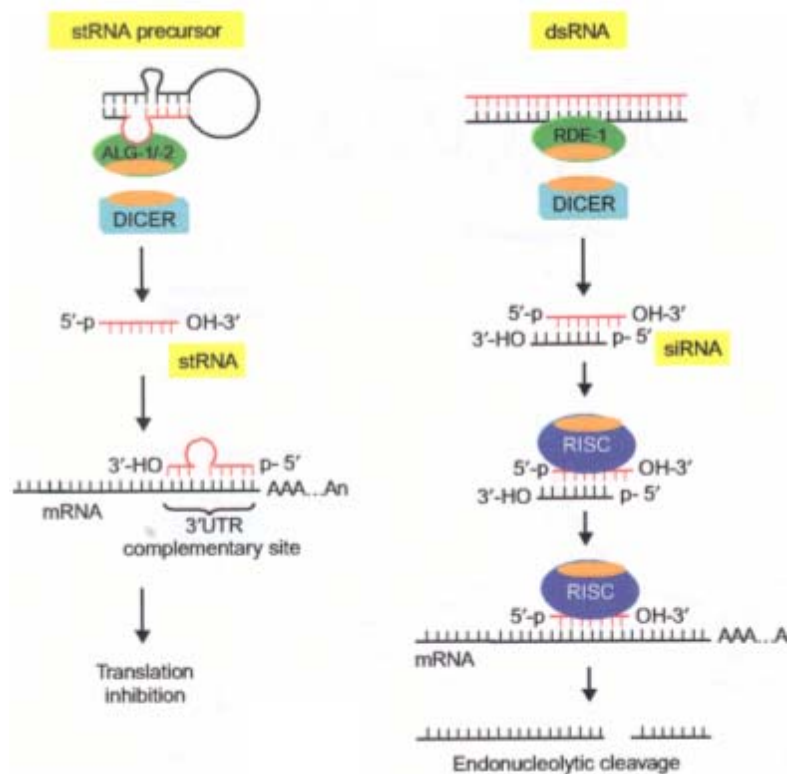


Figure 54. Mécanisme de l'ARN interférent

4.1.2. Description de la construction ARN interférent et du vecteur pBI-121

La stratégie utilisée lors de nos transformations a pour objectif la régulation post-transcriptionnelle, par le mécanisme d'ARN interférent, de l'isoforme de PME dont nous avons cloné la séquence partielle. La figure 55 présente un schéma de la construction ARN interférent insérée entre les bords gauche et droit de l'ADN-T du vecteur pBI-121. Cette construction est constituée d'une séquence sens du gène cible fusionnée avec une séquence d'intron accolée elle-même à une séquence en antisens du gène cible. L'expression de cette construction est sous le contrôle du promoteur constitutif 35S. Lors de la transcription de cette construction, une structure ARN-ARN en épingle à cheveux va être formée et stabilisée par l'intron. Après épissage de l'intron, le double brin ARNm-ARNm peut être pris en charge par la machinerie DICER.

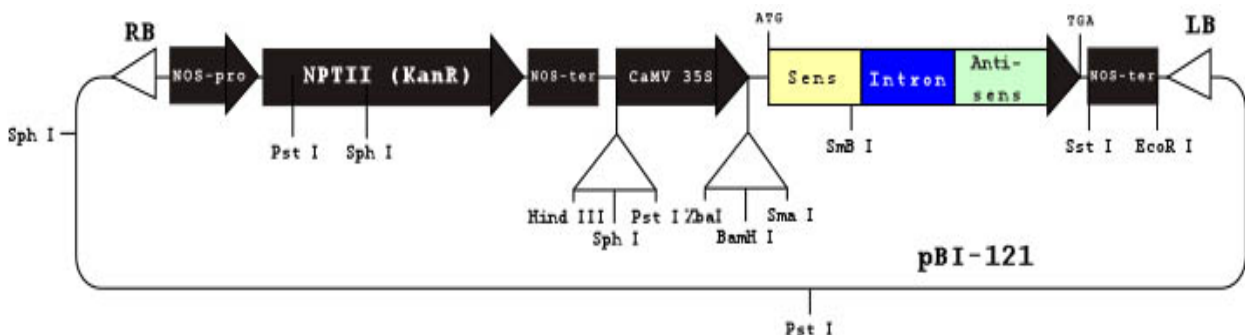


Figure 55 : Vecteur Pbi121

La sélection des cellules transformées sera réalisée sur milieu de régénération contenant de la kanamycine. Le gène de résistance à cet antibiotique se situe en amont de la construction ARN interférent entre les bords gauche et droit de l'ADN-T.

4.1.3. Transformation de fraisiers Calypso

Le protocole de transformation choisi pour ce travail est basé sur un brevet (WO 99/35903) traitant de la transformation du fraisier (cv. Chandler) par *Agrobacterium tumefaciens*. La seule différence majeure entre ce protocole et celui que nous avons utilisé repose sur le milieu de régénération qui est ici le milieu ZD102 ayant permis d'obtenir le matériel végétal *in vitro* (Passey *et al.*, 2003).

Tout d'abord, des explants foliaires provenant de fraisiers Calypso en culture *in vitro* ont été prélevés et déposés sur milieu de régénération ZD102 non sélectif. Ces explants ont été incubés deux jours à 25°C avec une photopériode de 16 heures. Ces explants ont ensuite été blessés avec une lame de scalpel stérile et mis en contact pendant 20 minutes avec une culture d'*Agrobacterium tumefaciens* (DO₆₀₀ égal à 0.6) de souche LBA 4404 VirG N54D et possédant le vecteur pBI-121-ARNi (PME). Après rinçage des explants avec de l'eau désionisée stérile, ceux-ci ont été placés sur milieu ZD102 non sélectif et incubés à l'obscurité pendant deux jours à 25°C pour permettre le transfert et l'intégration de l'ADN-T dans le génome de la plante au niveau des blessures (figure 56 A).

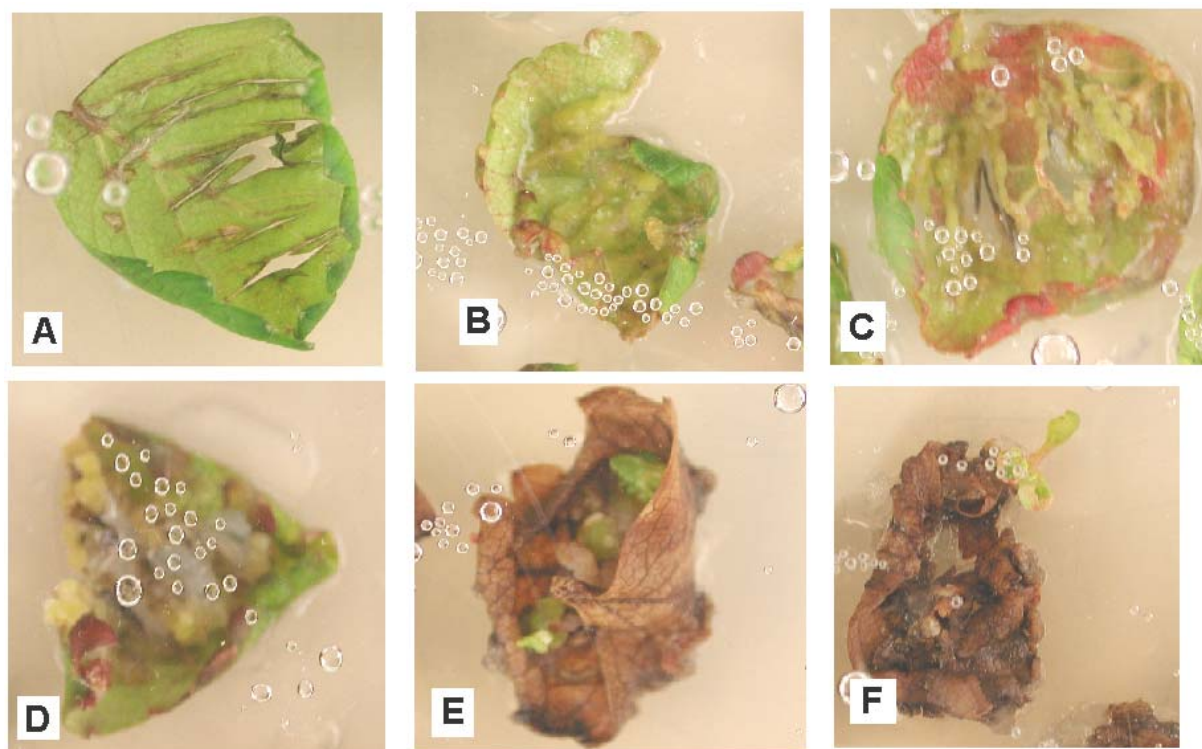


Figure 56. Evolution des transformants ARNi PME. Après excision des feuilles et transformation (A) sur milieu ZD102. Développement des cals sur milieu ZD102 avec Céfotaxime et Timentine (B et C). Transfert sur ZD102 avec Kanamycine pour la sélection des cellules végétales transformées (D). Nécrose des tissus non transformés, les cellules transformées du cal continue leur développement (E). Croissance d'une petite plantule à partir des cellules du cal (F).

Deux types de sélection de cellules transformées ont été testés. La sélection directe consiste à déposer les explants transformés, après la co-culture avec *Agrobacterium*, sur du milieu ZD102 sélectif. Ce type de sélection n'a permis aucun développement de cals, ni régénération, probablement suite à la pression de sélection trop forte dès le début de la régénération. Afin de permettre aux cellules végétales transformées de résister aux conditions de transformation, nous avons réalisé un deuxième type de sélection, la sélection différée, qui consiste à incuber les explants après co-culture avec *Agrobacterium*, d'abord sur un milieu ZD102 ne contenant que les antibiotiques utilisés pour éliminer les bactéries (céfotaxime à 100 mg/l et Timentine à 500 mg/l). Ensuite, après développement des premiers cals au niveau des blessures (après deux à trois semaines, figure 56 B et C), les explants ont été repiqués sur un milieu ZD102 sélectif (kanamycine à 25 mg/l) et incubés à 25°C avec une photopériode de 16h.

Une nécrose a été observée au niveau des tissus de l'explant quelques semaines après le passage sur milieu sélectif (figure 56 D et E). Ceci est la conséquence de l'incapacité des cellules non transformées à se maintenir sur ce milieu sélectif. Par contre, les cals non nécrosés ont continué leur croissance (figure 57 E). Un début d'organisation a été observé après quelques semaines au niveau des cellules des cals (figure 57). Ensuite, la régénération de petites plantules de quelques millimètres a été observée (figure 57 F). Toutefois, ces petites plantules n'ont pas continué à évoluer après trois semaines. Si l'on compare cette régénération par rapport à celle d'individus non transformés sur du milieu ZD102 sans antibiotique, le développement de cals et des premières plantules commence après environ 3 semaines. Dans le cas des transformants sur milieu ZD102 avec antibiotiques, le développement commence après six semaines et s'interrompt par la suite pour ne plus évoluer malgré que le tissu reste vivant.

Bien que nous n'ayons pas eu le temps de tester moléculairement l'intégration de la construction ARNi dans le génome de ces plantules, on peut émettre l'hypothèse que l'arrêt de leur développement de celle-ci pourrait être causé par le « silencing » constitutif de l'isoforme PME, dont nous avons obtenu la séquence partielle, ciblée par la construction ARNi. En effet, comme nous l'avons montré, il existe une forte homologie entre cette séquence et des séquences de PME impliquées dans les processus végétatifs.

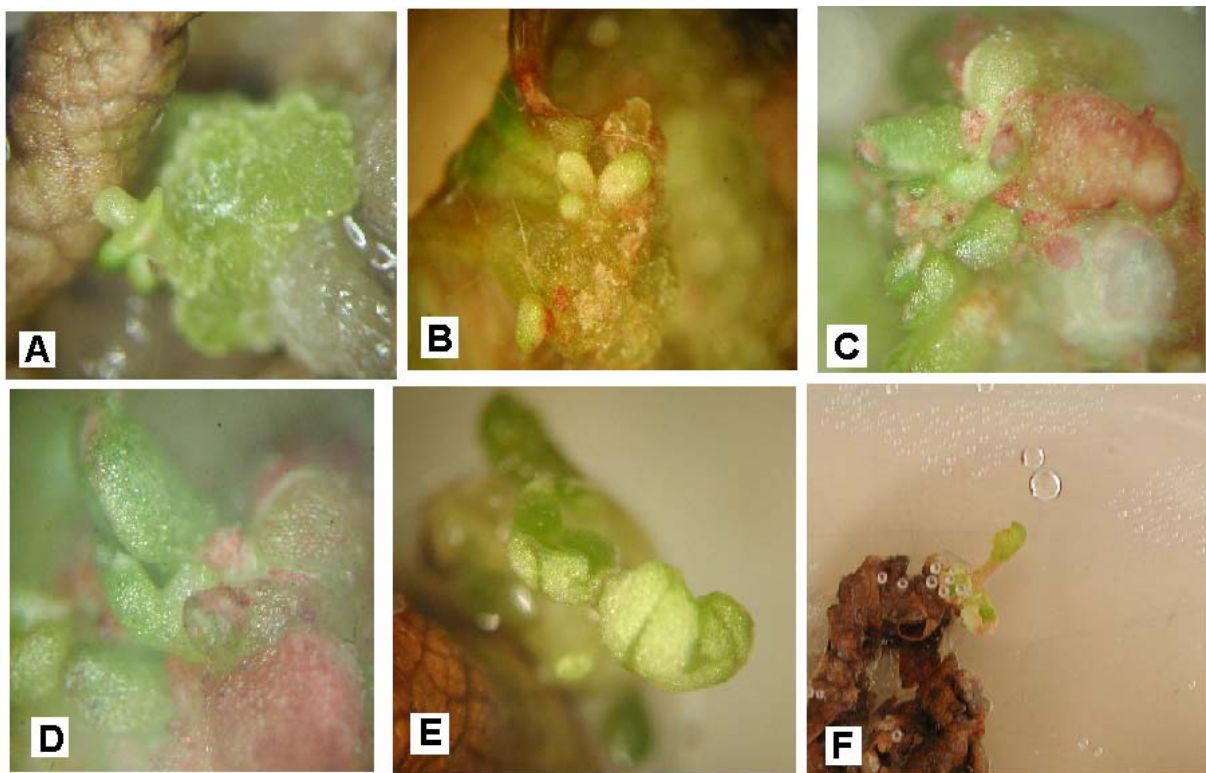


Figure 57. Agrandissement au binoculaire des cellules transformées du cal 1,6X (A). Différenciation des cellules, agrandissement 1,6X (B). Agrandissement 2,6 X (C) et 4 X (D). Développement d'une plantule, grossissement 2,5 X (E). Plantule développée (F)

Chapitre IV. Discussion générale

Chapitre IV. Discussion générale

Nous y faisons déjà référence au cours de l'introduction : le fruit subit un ramollissement de sa texture lors des derniers stades de son développement. Ce phénomène a pour origine la dégradation de la paroi cellulaire sous l'action d'enzymes dont font partie les pectate lyases, les endo-1,4- β -glucanases ou encore les pectines méthylestérases (PME). Un projet de recherche a été mis en place au laboratoire afin de mieux appréhender ces mécanismes de ramollissement. Le travail que nous avons réalisé lors de ce mémoire s'intègre dans cette recherche.

Notre objectif est donc de mieux comprendre le rôle joué par une classe de ces enzymes, les PME. Pour ce faire nous avons entrepris une étude de l'enzyme à la fois au niveau biochimique et au niveau moléculaire chez la variété de fraiser Calypso. Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la modification du substrat pectique par les PME ainsi qu'à l'activité de ces enzymes lors des différents stades de développement du fruit. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons entrepris le clonage de séquences de PME exprimées au cours de la maturation. Enfin, nous avons réalisé la transformation de fraisiers avec une construction ARN interférent dirigée contre les PME.

Dans cette discussion générale, nous essayerons d'intégrer nos résultats sur l'étude des PME et de les situer par rapport à la littérature.

Chez les fruits, le ramollissement et la détérioration tissulaire sont souvent associés à un désassemblage du réseau pectique de la paroi cellulaire végétale dans les derniers stades de maturation, comme il a été observé par exemple chez la tomate (Hadfield et Bennett, 1998). De même chez la fraise, Knee et ses collaborateurs (1977) ont mis en évidence l'augmentation de la quantité de pectines solubles par rapport à la pectine liée à la paroi lors de la maturation du fruit. Parmi les enzymes potentiellement responsables de la désorganisation du réseau pectique, des polygalacturonases (Redondo-Nevado *et al.*, 2001 ; Nogata *et al.*, 1993) et des pectate lyases (Medina-Escobar *et al.*, 1997 ; Benitez-Burraco *et al.*, 2003) ont été détectées chez la fraise. Les PL semblent jouer un rôle important dans le ramollissement lors des derniers stades de la maturation de la fraise (Jimenez-Bermudez *et al.*, 2002). Toutefois, comme leur nom l'indique, leur substrat est la pectate. La pectine étant synthétisée sous forme hautement méthylestérifiée (Carpita et Gibeaut, 1993), l'action préalable des PME est indispensable pour permettre l'action ultérieure des enzymes hydrolytiques PG et PL.

Pour mettre en évidence le rôle joué par les PME dans le développement de la fraise, nous nous sommes tout d'abord intéressés à son substrat, la pectine méthylestérifiée. Par test immunochimique avec un anticorps reconnaissant spécifiquement les structures en « egg-box » formées par les pectines acides en présence d'ions Ca^{2+} (Liners *et al.*, 1992), nous avons mis en évidence une diminution significative du taux de méthylation des pectines au cours du développement, avec une prédominance de pectines acides observées lors du stade rouge mature. De plus, nous avons observé une diminution de la quantité totale de pectine lors de la maturation de la fraise. Ce genre d'observation a été réalisé chez la framboise (Stewart *et al.*, 1998) et la pêche (Lurie *et al.*, 2003), où une réduction importante de la composition en pectine et de son degré de méthylestérification a été observée lors de la maturation. Chez ces organismes, en fin de maturation, le taux de méthylation de la pectine est encore de 47 % pour la pêche et 14 % pour la framboise, alors qu'il est proche de 0 % chez la fraise. La diminution de la quantité totale de pectine est à mettre en corrélation avec la dégradation du réseau pectique, et plus spécifiquement des pectates, sous l'action sans doute des PL exprimées depuis le stade blanc jusqu'au stade mature (Medina-Escobar *et al.*, 1997).

Pour qu'il y ait diminution du taux de méthylestérification, il faut qu'il y ait expression de PME au cours du développement du fruit. Par « cup plate » et test colorimétrique, nous avons mis en évidence l'activité différentielle des PME au cours du développement de la fraise. Tout comme Barnes et Patchett (1976) l'avaient montré précédemment, nous avons observé une activité maximale des PME lors des stades précoces du développement (G1 et G3), lorsque le fruit est en croissance. Ensuite, l'activité PME diminue graduellement jusqu'à un minimum lors du stade sénescence. L'activité PME décline à partir du stade blanc lorsque le début de l'expression de la pectate lyase spécifique de la maturation est observé (Medina-Escobar *et al.*, 1997). Un schéma identique d'expression se retrouve chez la framboise mais cette fois-ci, il s'agit d'une PG dont l'expression commence au début de la maturation après une chute de l'activité PME qui était maximale lors des stades précoces du développement (Majumder et Mazumdar, 2002). De même, lors du développement du raisin, l'activité PME maximale est détectée avant la véraison, lorsque le fruit est encore en croissance (Barnavon *et al.*, 2001), avant de chuter lors de la maturation.

Tout comme chez l'avocat, nous avons observé que la diminution de la méthylestérification des pectines est parallèle à la diminution de l'activité PME détectable au cours du développement (Wakabayashi *et al.*, 2000). Chez le raisin également, l'effet des PME sur la pectine est observé avec un décalage dans le temps par rapport à son schéma d'expression car le taux de méthylation des pectines diminue au cours de la maturation. La diminution du taux de méthylation des pectines sous l'action des PME est un phénomène cumulatif. S'il n'y a pas néo-synthèse de pectine, le taux de méthylation ne peut pas augmenter. L'activité cumulée des PME au cours du développement de la fraise va donc conduire à une déméthylation élevée en fin de maturation, malgré une diminution de l'activité PME mesurée.

Nous avons mis en évidence la présence de six isoformes de PME exprimées au cours du développement de la fraise. Ces isoformes ont des pI alcalins allant de 8,1 à 10,1 (la grande majorité des PME décrites dans la littérature sont de types neutres ou basiques). Le schéma d'expression de ces six isoformes est en accord avec nos observations précédentes. En effet, l'expression des isoformes est constante lors des premiers stades pour chuter ensuite lors de la maturation. L'isoforme majoritairement exprimée au cours du développement est l'isoforme la plus basique. Son expression est double dans les stades G1, G3 et W par rapport à l'activité observée dans les stades fruit rouge mature et sénescence. Toutefois, ces six isoformes sont ubiquistes et ne sont pas spécifiques de la maturation. En effet, nous avons mis en évidence l'expression de celles-ci dans des organes végétatifs du fraisier comme les feuilles et les stolons. Ce sont des organes en croissance dont les cellules se divisent et dont la paroi cellulaire est modifiée. Les PME détectées chez la fraise pourraient donc jouer un rôle dans ces phénomènes. Par exemple, chez la pomme de terre, la surexpression d'une PME induit une accélération de la croissance des tiges (Pilling *et al.*, 2000). De même, chez le pois (*Pisum sativum*), l'activité des PME dans les racines est corrélée avec la séparation de cellules du bout de la racine lors du développement de celle-ci (Stephenson et Hawes, 1994).

L'étude moléculaire menée en parallèle de l'étude biochimique, nous a permis dans un premier temps d'obtenir une séquence partielle de 225 pb par PCR sur de l'ADNc synthétisé à partir d'ARN de fruit rouge. Les amorces utilisées ont été déterminées dans deux zones très conservées entre les différentes PME déjà caractérisées. Sur base de cette séquence, nous avons entrepris d'obtenir une séquence totale par 3' et 5' RACE. Toutefois, seule une séquence nucléotidique partielle de 720 pb environ a pu être obtenue (celle-ci allant jusqu'au polyA). Les alignements de cette séquence convertie en acides aminés avec des séquences des banques de données électroniques ont confirmé son appartenance à la famille des PME végétales. Par alignement avec des séquences de PME dont le site actif a été caractérisé (Johansson *et al.*, 2002), nous avons mis en évidence une partie de celui-ci au niveau de notre séquence.

Comme nous l'avons signalé à plusieurs reprises, un article traitant des PME du fraisier (cv. Chandler) a été publié par Castillejo *et al.* (2004) au cours de la rédaction de ce mémoire. Les alignements réalisés avec notre séquence et celles de l'article (FaPE1 à FaPE4) ont mis en évidence l'homologie parfaite de notre séquence avec l'isoforme FaPE3. Cette isoforme FaPE3 est exprimée dans tous les stades de développement du fruit jusqu'au stade sénescence. On la retrouve également dans les organes végétatifs comme les feuilles et les stolons. De même, 91,5 % d'homologie est partagée entre notre séquence partielle et FaPE4, une isoforme ubiquiste sans doute impliquée également dans les processus végétatifs. De plus, notre séquence partielle présente environ 86 % d'homologie avec l'isoforme PMEU1 (AY046596), qui fait partie d'une classe de PME responsable du maintien de l'intégrité cellulaire (Gaffe *et al.*, 1997). L'isoforme caractérisée dans cet article de Gaffe et ses collaborateurs possède un pI de 9,2. Son activité au cours du développement de la tomate commence également à diminuer à partir du stade vert mature. Notre séquence partielle fait donc plus que probablement partie d'un groupe de PME impliquées dans des processus de modification de la paroi lors de phénomènes de croissance dans des organes en développement. Bien que nous pensions à ce stade que l'isoforme clonée est sans doute impliquée dans des phénomènes autres que le ramollissement du fruit, celle-ci possède toutefois 83 % d'homologie avec la séquence spécifique de la maturation FaPE1. De plus, notre séquence présente 76 % d'homologie avec une PME de tomate spécifique de la maturation (Gaffe *et al.*, 1997).

Dans le but d'étudier les PME *in situ*, nous avons réalisé des transformations de fraisiers Calypso, avec *Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction ARNi-PME (correspondant à notre séquence partielle de 225 pb). Nous avons observé le développement de cals, le début d'organisation cellulaire au niveau de ceux-ci, ainsi que le développement de petites plantules. Malheureusement le développement de ces plantules ne s'est pas poursuivi. En effet, les petites plantules se maintiennent dans un état chétif malgré des repiquages successifs sur milieux de culture frais. Ces observations pourraient confirmer notre hypothèse selon laquelle la séquence partielle obtenue code pour une PME qui interviendrait dans la croissance cellulaire et le maintien de l'intégrité de la paroi.

Nous savons que les PME contribuent à la formation de pectines acides. Ces pectines interviennent dans le mécanisme de transduction du signal entre autres par interaction avec un récepteur kinase spécifique de la paroi cellulaire végétale, WAK (pour « wall associated kinase ») qui fait l'objet d'une étude au laboratoire. Il a été montré que les récepteurs WAK intervenaient dans des processus de réponse aux pathogènes, mais également dans l'élongation cellulaire. Cette dernière observation est intéressante, car l'élongation cellulaire est indispensable au développement des végétaux (Wagner *et al.*, 2001).

En conclusion, les PME font partie d'une famille multigénique qui comporte chez la fraise au moins six membres. Le rôle des PME semble double lors du développement du fruit. Dans un premier temps, elles participeraient à la croissance du fruit lors des stades précoces, lorsque les cellules de celui-ci se divisent et augmentent de volume. Ensuite, la pectine faiblement méthylée suite à l'action de ces enzymes serait dégradée par les PL lors des derniers stades de maturation du fruit. La diminution de la quantité totale de pectine observée au cours du développement constitue un argument supplémentaire en ce sens. Enfin, les PME seraient indispensables à la croissance et à la différenciation des organes végétatifs comme le suggèrent les résultats obtenus suite aux transformations réalisées dans le but d'éteindre l'expression de l'isoforme ubiquiste dont nous avons cloné la séquence. Celles-ci menant à un arrêt du développement des plantules régénérées.

Chapitre V. Persepectives

Chapitre V. Perspectives

Les résultats obtenus lors de ce travail nous permettent d'envisager différentes perspectives dans le cadre de l'étude des PME au cours du développement de la fraise.

A court terme, l'analyse moléculaire des transformants obtenus (vérification de la présence et de l'intégrité de la construction ARNi-PME, localisation de la zone d'insertion, efficacité de l'extinction ...) et l'étude de la composition en pectine de la paroi cellulaire de ces transformants par rapport à des plantes témoins sont prioritaires. L'analyse de pectine devrait être réalisée en microscopie électronique après immunomarquage avec l'anticorps 2F4 (anti « egg-box ») de plantules et de cals en développement, afin de déterminer la nature des pectines présentes chez les transformants par rapport à des plants contrôles.

Les résultats des régénérations que nous avons obtenues avec une construction incluant un promoteur constitutif montrent l'importance qu'il y a à utiliser un promoteur spécifique du fruit, afin de limiter l'extinction du gène cible à ce seul organe. Le promoteur choisi pour remplacer le CaMV-35S pourrait simplement être celui de FaPE1, l'isoforme de PME spécifique de la maturation du réceptacle chez la fraise. Ceci nécessiterait le clonage complet du gène FaPE1. Alternativement, les promoteurs des cellulases Cel1 et Cel2 spécifiques respectivement de la maturation et du développement de la fraise (Spolaore *et al.*, 2003) pourraient également être utilisés.

A moyen terme, il serait intéressant d'obtenir les séquences des isoformes principales de PME du fruit, afin d'étudier leur implication *in situ* dans les processus de développement et de maturation de ce fruit. Pour ce faire, des constructions ARN interfèrent pourraient être réalisées avec des régions spécifiques de chacune des classes de PME, puis transférées dans le génome de la plante par transformation avec *Agrobacterium tumefaciens*. Après régénération, acclimatation en terre et induction florale, les propriétés des fruits pourraient être analysées. L'implication des PME dans le ramollissement de ces fruits serait évaluée en comparant la résistance mécanique du fruit et les propriétés de la pectine des lignées transgéniques et des plantes témoins.

Les séquences des différentes isoformes de PME pourraient être utilisées comme sondes pour déterminer les profils d'expression de ces gènes par Real Time PCR. Ces profils seraient alors confrontés avec les résultats des tests d'activité biochimique et d'IEF. Par immunomarquage de coupes histologiques d'organes végétatifs et de fruits prélevés aux différents stades de développement, nous pourrions localiser ces PME et ainsi interpréter leur mode d'action chez le fraisier. Pour ce faire, un ou plusieurs sérums spécifiques de ces PME devront préalablement être produits.

Enfin, à plus long terme, si l'importance des PME dans le ramollissement de la fraise devait se confirmer, ces séquences caractérisées pourraient être utilisées en sélection assistée par marqueurs moléculaires afin d'obtenir des lignées de fraisiers non transgéniques, mais bénéficiant d'un ramollissement ralenti du fruit. En effet, les pectines y seraient maintenues à l'état méthylestérifié plus longtemps lors du développement du fruit, retardant d'autant l'action des enzymes pectolytiques PG et PL. Un tel fruit conserverait une texture ferme plus longtemps sans interférence avec les autres mécanismes de la maturation, à savoir l'accumulation de pigments, de sucres et de flaveur qui pourrait se poursuivre sur une plus longue période.

Chapitre VI. Bibliographie

Bibliographie

1. Assis S.A.de, Lima D.C., de Faria Oliveira O.M.M. (2001) Activity of pectin methylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. *Food Chemistry* 74 : 133-137.
2. Almeida D.P.F., Huber D.J. (1999) Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: a potentiel means for regulation of cell wall metabolism during ripening. *Plant Physiology* 105: 506-512.
3. Barnavon L., Doco T., Terrier N., Ageorges A., Romieu C., Pellerin P. (2001) Involvement of pectin methylesterase during the ripening of grape berries : partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry* 58 : 693-701.
4. Barnes M. F. and Patchett B. J. (1976) Cell wall degrading enzymes and the softening of senescent strawberry fruit. *Journal of Food Science* 41 : 1392-1395.
5. Benitez-Burraco A., Blanco-Portales R., Redondo-Nevado J., Bellido M. L., Moyano E., Caballero J.-L., and Munoz-Blanco J. (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *Journal of Experimental Botany* 54(383) : 633-645.
6. Bordenave M. (1996) Analysis of pectin methyl esterases. *Modern Methods of Plant Analysis* 17 : 165-180.
7. Bramley P.M. (2002) Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany* 53: 2107-2113.
8. Brown, D. (2002) *The Royal Horticultural Society New Encyclopedia of Herbs and their Uses*. Dorling Kindersley, London
9. Brummel D. A., Harpster M. H. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality an its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47 : 311-340.
10. Carpita N. C. and Gibeaut D. M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3 : 1-30.
11. Carrington C. M. S., Greve L. C., and Labavitch J. M. (1993) Cell wall metabolism in ripening fruit. *Plant Physiology* 103: 429-434.
12. Cassab G.I. (1998) Plant cell wall proteins. *Annual Reviuw Plant Physiology* 49: 281-309.
13. Castillejo C., Ignacio de la Fuente J., Iannetta P., Botella M.A. et Valpuesta V. (2004) Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening-specific isoform. *Journal of Experimental Botany* 55: 909-918.
14. Catoire L., Pierron M., Morvan C., Hervé du Penhoati C., and Goldberg R. (1998) Investigation of the action patterns of pectinmethylesterase isoforms through kinetic analyses and NMR spectroscopy : implications in cell wall expansion. *Journal Biochemistry* 273(50) : 33150-33156.
15. Chun J. P. and Huber D. J. (1997) Polygalacturonase isozyme 2 binding and catalysis in cell walls from tomato fruit: pH and -subunit effects. *Physiologia Plantarum* 101 : 283-290.
16. Civello P. M., Chaves A. R., and Anon M. C. (1996) Change in protein composition during strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit ripening. *Journal of Food Biochemistry* 20 : 135-153.
17. Civello P. M., Powell A. L. T., Sabehat A., and Bennett A. B. (1999) An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology* 121 : 1273-1279.

18. Coombe B. G. (1976) The development of fleshy fruits. Annual Review Plant Physiology 27 : 507-528.
19. Denès J.-M., Baron A., Renard C. M. G. C., Péan C., and Drilleau J.-F. (2000) Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7.0 and 4.5. Carbohydrate Research 327 : 385–393.
20. Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., and Mello C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-811.
21. Gaffe J., Tieman D.M., Handa A.K. (1994) Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicon esculentum*) tissues. Plant Physiology 105: 199-203.
22. Giovane A., Balestrieri C., Quagliuolo L., Castaldo D., and Servillo L. (1995) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit. Purification by affinity chromatography and evidence of a ripening-related precursor. EJB, 233: 926-929.
23. Giovane A., Servillo L., Balestrieri C., Raiola A., D'Avino R., Tamburrini M., Ciardiello M.A., Camardella L. (2004) Pectin methylesterase inhibitor. Biochimica et Biophysica 1696: 245-252.
24. Given N. K., Venis M. A., and Grierson D. (1988) Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. Planta 174 : 402-406.
25. Grasdalen H., Andersen A. K., and Larsen B. (1996) NMR spectroscopy studies of the action pattern of tomato pectinesterase: generation of block structure in pectin by a multiple-attack mechanism. Carbohydrate Research 289 : 105-114.
26. Hadfield K.A. et Bennett A.B. (1998) Polygalacturonases: Many Genes in Search of a Function. Plant Physiology 117: 337-343.
27. Hall L. N., Tucker G. A., Smith C. J. S., Watson C. F., Seymour G. B., Bundick Y., Boniwell J. M., Fletcher J. D., Ray J. A., Schuch W., Bird C. R., and Grierson D. (1993) Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. Plant Physiology 3: 121-129.
28. Harpster M. H., Brummell D. A., Dunsmuir P. (1998) Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1,4- β -glucanase gene in strawberry. Plant Physiology 118 : 1307-1316.
29. Harrison E. P., McQuenn-Mason S. J., and Manning K. (2001) Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. Journal of Experimental Botany 52(360) : 1437-1446.
30. Huber D. J., Karakurt Y., Jeong J. (2001) Pectin degradation in ripening and wounded fruits. Plant Physiology 13(2) 224-241
31. Jiménez-Bermudez S., Redondo-Nevado J., Muñoz-Blanco J., Caballero J. L., Lopez-Aranda J. M., Valpuesta V., Pliego-Alfaro F., Quesada M. A., and Mercado J. A. (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. Plant Physiology 128 : 751-759.
32. Johansson K., El-Ahmad M., Friemann R., Jörnvall H., Markovic O., and Eklund H. (2002) Crystal structure of plant pectin methylesterase. FEBS Letters 514 : 243-249.
33. Kalaitzis P., Solomos T., and Tucker M. L. (1997) Three different polygalacturonase are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. Plant Physiology 113 : 1303-1308.
34. Karakurt Y., Huber D. J. (2002) Cell wall-degrading enzymes and pectin solubility and depolymerization in immature and ripe watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit in response to exogenous ethylene. Physiologia Plantarum 116 : 398 – 405

35. Knee M., Sargent J. A., and Osborne D. J. (1977) Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany* 28(103) : 377-396.
36. Koh T.H., Melton L.D. (2002) Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biology and Technology* 26: 23-33.
37. Koning R.E. (1994) «Fruit growth and ripening». Plant Physiology Website http://koning.ecsu.ctstateu.edu/plants_human/fruitgrowripe.html.
38. Liners F., Thibault J-F. Et Van Cutsem P. (1992) Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by monoclonal antibodies. *Plant Physiology* 99 : 1099-1104.
39. Llop-Tous I., Dominguez-Puigjaner E., Palomer X., and Vendrell M. (1999) Characterization of two divergent endo- β -1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiology* 119 : 1415-1421.
40. Ly-Nguyen B., Van Loey A. M., Fachin D., Verlent I., Duvetter T., Vu S. T., Smout C., and Hendrickx M. E. (2002) Strawberry pectin methylesterase (PME) : purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation. *Biotechnology Program* 18 : 1447-1450.
41. Lurie S., Zhou H-W., Lers A., Lers A., Sonogo L., Alexandrov S., Shomer I. (2003) Study of pectin esterase and changes in pectin methylation during normal and abnormal peach ripening. *Physiologia Plantarum* 119 : 287-294.
42. MacLachlan G., Brady C. (1994) Endo-1,4-b-glucanase, xyloglucanase, and xyloglucan endo-transglycosylase activities versus potential substrates in ripening tomatoes. *Plant Physiology* 105 : 965-974
43. Majumder K. and Mazumdar B. C. (2002) Change of pectic substances in developing fruits of cape-gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in relation to the enzyme activity and evolution of ethylene. *Scientia Horticulturae*, 96 : 91-101.
44. Manning K. (1994) Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta* 194 : 62-68.
45. Manning K. (1998) Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry : their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* 205 : 622-631.
46. Marin-Rodriguez M. C., Orchard J., and Seymour G. B. (2002) Pectate lyase, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany* 53(377) : 2115-2119.
47. McMillan G.P. Pérombelon M.C.M. (1995) Purification and characterisation of a high pI PME isoenzyme and its inhibitor from tubers of *Solenum tuberosum*. *Physiology Molecular Plant Pathogen* 46 : 413-427.
48. Medina-Escobar N., Cardenas J., Moyano E., Caballero J. L., and Munoz-Blanco J. (1997) Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Molecular Biology* 34 : 867-877.
49. Micheli F. (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* 6(9) : 414-419.
50. Nogata C., Ohta H., and Voragen A. G. J. (1993) Polygalacturonase in strawberry fruit. *Phytochemistry* 34(3) : 617-620.
51. O'Neill *et al* (1996) Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is cross-linked by a borate ester - in vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *JBC* 271 : 22923-22930.

52. Passey A. J., Barrett K. J., James D. J. (2003) Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types. *Plant Cell* 21: 397-401.
53. Perrin R.M., DeRocher A.E., Bar-Peled., Zeng W., Norambuena L. Orellana A. Raikhel N.V., Keegstra K. (1999) Xyloglucan fucosyl transferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science* 284: 1976-1979.
54. Pilling J., Willmitzer L., and Fisham J. (2000) Expression of a *Petunia inflata* pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. enhances stem elongation and modifies cation distribution. *Planta* 210 : 391-399.
55. Redondo-Nevado J., Moyano E., Medina-Escobar N., Caballero J. L., and Munoz-Blanco J. (2001) A fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria X ananassa* cv. Chandler). *Journal of Experimental Botany* 52(362) : 1941-1945.
56. Reiter W-D. (2002) Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*. 5 : 536-542.
57. Ren C., Kermode A.R. (2000) An increase in pectin methyl esterase activity accompnies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiology* 124: 231-242.
58. Ricard J., Noat G. (1986) Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. *JBC* 57: 929-967.
59. Richard L., Qin L.-X., Gadai P., and Goldberg R. (1994) Molecular cloning and characterization of a putative pectin methylesterase cDNA in *Arabidopsis thaliana* (L.). *FEBS Letters* 355: 135-139.
60. Ridley B.L., O'Neil M.A., Mohnen D. (2000) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling. *Phytochemistry* 57: 929-967.
61. Rose J. K. C. and Bennett A. B. (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science* 4: 176-183.
62. Salentijn E. M. J., Aharoni A., Schaart J. G., Boone M. J., and Krens F. A. (2003). Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiologia Plantarum* 118 : 571-578.
63. Sauer, J.D. 1993. Historical geography of crop plants - a select roster. CRC Press, Boca Raton, Florida
64. Shackel K.A., Greve C., Labavitch J.M., Ahmadi H. (1991) Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiology* 97: 814-816.
65. Spolaore S., Trainotti L., Pavanello A., and Casadoro G. (2003) Isolation and promoter analysis of two genes encoding different endo- β -1,4-glucanases in the non-climacteric strawberry. *Journal of Experimental Botany* 54 (381) : 271-277.
66. Stephenson M. B. and Hawes M. C. (1994) Correlation of pectin methylesterase activity in root caps of pea with root border cell separation. *Plant Physiology* 106 : 739-745.
67. Stewart D., Iannetta P.P.M. et Davies H.V. (1998) Ripening-related changes in raspberry cell wall composition and structure. *Plant Physiology* 117: 337-343
68. Taylor N. G., Laurie S., and Turner S. R. (2000) Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12 : 2529-2539.
69. Trainotti L., Spolaore S., Pavanello A., Baldan B., and Casadoro G. (1999) A novel E-type endo- β -1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Molecular Biology* 40 : 323-332.

70. Tucker G. A. (1993) Introduction. Biochemistry of fruit ripening, Seymour, Taylor, Tucker, Chapman & Hall : 1-48.
71. Visser J., Voragen A.G.J. (1996) Pectin and pectinases, progress in biotechnology Vol. 14. Elsevier, Amsterdam.
72. Wagner T.A. et Kohorn B.D. (2001) Wall associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. The Plant Cell 13: 303-318.
73. Wakabayashi K., Chum J.-P., and Huber D. J. (2000) Extensive solubilization and depolymerization of cell wall polysaccharides during avocado (*Persea americana*) ripening involves concertes action of polygalacturonase and pectinmethylesterase. Physiologia Plantarum 108 : 345-352.
74. Willats W.G.T., Orfila C., Limberg G., Buchholt H.C., van Alebeek G-J.W.J., Voragen A.G.J., Marcus S.E., Christensen T.M., Mikkelsen J.D., Murray B.S., Knox J.P. (2001) Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell wall. JBC 276 : 19404-19413.
75. Wing R.A., Yamaguchi J., Larabell S.K., Ursin V.M. et McCrmick S. (1989) Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. Plant Molecular Biology 14 : 17-28.
76. Wooley L. C., James D. J., and Manning K. (2001) Purification and properties of an endo- β -1,4-glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, cell. Planta 214 : 11-21.
77. Yoda S. (1954) Auxin action and pectin enzyme. Botanic Magazine Tokyo 71 : 207-213.
78. Yoder M.D., Keen N.T. and Jurnak F. (1993) Structure 1: 241-251.